

ZUR FEINSTRUKTUR, CYTOCHEMIE UND
PERMEABILITÄT DER DORSALEN RIESEN-
FASERSEPTEN VON REGENWÜRMERN

DORIS OESTERLE

1976

ZUR FEINSTRUKTUR, CYTOCHEMIE UND PERMEABILITÄT
DER DORSALEN RIESENFASERSEPTEN VON REGENWÜRMERN
(LUMBRICUS TERRESTRIS, L., EISENIA FOETIDA, SAV.,
CLITELLATA, OLIGOCHAETA, ANNELIDA)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität
zu München



vorgelegt von
Doris Oesterle
aus Oberndorf/Neckar

München 1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr.Dr.h.c. H. Autrum
2. Berichterstatter: Dr. K. Moritz

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.F.G.Barth durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.H. Autrum bin ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.F.G.Barth für die Überlassung des Themas, viele Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frl. H. Tscharncke für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, Frl. F. Althaus für die Anfertigung eines Teils der Zeichnungen und der Arbeitsgruppe Dr.F. Zettler/R. Weiler für die Benützung des Fluoreszenzmikroskops.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	
A) Geschichtlicher Überblick	1
B) Zielsetzung	3
Material und Methoden	5
Ergebnisse	
I) Topographie der Riesenfasersepten	10
II) Feinbau der Riesenfasersepten	
A) Septalmembranen und Septalspalt	
1) Grundtyp	11
2) Spezialisierungen	12
B) Cytochemie des Septalkomplexes	
1) E-PTA-Imprägnation	14
2) BIUL-Imprägnation	16
3) Lanthanimprägnation	16
C) Rekonstruktion des Septalkomplexes	17
III) Vesikel	
A) Topographie und Feinstruktur	18
B) Cytochemie der Vesikel	
ZIO-Imprägnation	18
C) Statistik der Vesikelgrößen	19
IV) Transseptale Permeabilität	
Procion Yellow-Iontophorese	27
V) Mikrotubuli und Neurofilamente	29
Diskussion	
I) Topographie' der Riesenfasersepten	30
II) Feinbau des Septalkomplexes	31
A) Orte der elektrischen Kopplung	
1) "Gap junctions"	32
2) Nicht spezialisierte Membranen	37

	Seite
B) Nichtsynaptische Membran-	
spezialisierungen	38
C) Ausnahmebefunde	39
D) Fixierungsabhängigkeit	40
III) Cytochemie des Septalkomplexes	
A) Imprägnation von spezialisierten	
Membrankontakten mit E-PTA und BIUL	41
1) "Intermediate junctions"	42
2) "Gap junctions"	42
B) Imprägnation des Septalspalts	
mit Lanthan	44
IV) Vesikel	
A) Vergleich mit Vesikeln an	
chemischen Synapsen	46
B) Statistische Auswertung der	
Vesikeldurchmesser	47
C) ZIO-Imprägnation	48
D) Topographie und funktionelle	
Konsequenzen	50
E) Vergleich mit neurosekretorischen	
Vesikeln	53
V) Transseptale Permeabilität	54
VI) Mikrotubuli und Neurofilamente	58
Zusammenfassung	60
Literaturverzeichnis	62
Abbildungslegende	74-83
Abbildungen	

EINLEITUNG

A) Geschichtlicher Überblick

Im Zentralnervensystem wirbelloser Tiere, wie z.B. bei Insekten, Cephalopoden, Krebsen und Anneliden findet man Riesenfasern, die durch ihren großen Durchmesser gegenüber den anderen Nervenfasern auffallen. Im Bauchmark der Regenwürmer liegen dorsal drei solcher Fasern mit eigener Gliashülle: eine mediane, deren Durchmesser bis zu 100 μm erreicht, und zwei laterale, die mit bis zu 50 μm Durchmesser etwas kleiner bleiben. Obwohl der cytologische Aufbau der Riesenfasern in verschiedenen Stämmen und Klassen der Invertebraten unterschiedlich ist, spielen sie doch allgemein eine wesentliche Rolle bei der Koordination schneller Bewegungsabläufe, z.B. dem Fluchtverhalten.

Schon im letzten Jahrhundert war das Vorhandensein besonders großer Fasern im ZNS von Invertebraten bekannt (Lit.: Nicol, 1948). Ehrenberg beschreibt 1836 zum ersten Mal Riesenfasern bei Krebsen. Claparède (1861) und Keferstein (1863) fanden diese auffälligen Strukturen bei Oligochaeten und Polychaeten.

Da die Riesenfasern nach Größe und Aussehen ("Kolossalfasern") zunächst überhaupt nicht in die damalige Vorstellung von Nervenfasern paßten, blieb ihre wahre Natur noch lange Zeit nach ihrer Entdeckung im Dunkeln. In Unkenntnis ihrer tatsächlichen Bedeutung wurde den Riesenfasern ein breites Spektrum an möglichen Aufgaben unterlegt. Es reicht von Ernährungs-, Exkretions-, Stützfunktion mit und ohne Homologisierung mit der Chorda der Wirbeltiere bis zur Feststellung, daß es Kanäle ohne definierte Funktion seien. Nach einer anderen Auffassung sollten die Riesenfasern degenerierte nervöse Strukturen sein. Schließlich erkannte Leydig (1864a, 1865, 1866) anhand von histologischen Untersuchungen, daß die Riesenfasern wirkliche Nervenfasern sind.

Obwohl die nervöse Natur der Riesenfasern bei Krebsen allgemein anerkannt wurde, gingen die Meinungen bezüglich der Struktur der Riesenfasern der Anneliden nach wie vor auseinander. Nachfolgende Untersuchungen untermauerten jedoch die Annahme, daß die Riesenfasern allgemein Nervenfasern seien. So fand Schultze (1879) Neurofibrillen in Riesenfasern von Regenwürmern und zeigte, daß die Hüllen aus Myelin bestehen. Klassisch sind inzwischen die Arbeiten von Friedländer (1888, 1889, 1894) geworden, in denen er Verbindungen zwischen Riesenaxonen und Nervenzellen bei Lumbricus und Mastobranchus und Myelin in den Axonscheiden nachwies.

Ab 1900 wurde die Nervennatur der Riesenfasern bei Anneliden allgemein vertreten. Als charakteristisch galten folgende Merkmale: Neurofibrillen, Myelinhülle und Herkunft von Nervenzellen.

In den folgenden Jahren machte die Kenntnis der Anatomie der Riesenfasern weitere Fortschritte. Hanaker hatte schon 1898 bei Polychaeten eine Struktur gefunden, die sich später als ein wichtiges Glied bei der Erregungsleitung in der Riesenfaser erweisen sollte, und deren Funktion im einzelnen bis heute nicht völlig geklärt ist. Es handelt sich um Trennwände zwischen einzelnen Axonabschnitten, die Septen. Etwas später wurden sie auch bei Oligochaeten (Schneider, 1902) und anderen Invertebraten in Riesenfasern gefunden.

Gemäß ihrem metameren Bauplan zeigen Krebse (Johnson, 1924) und Oligochaeten (Stough, 1926) eine segmentale Gliederung der Riesenfasern durch Septen.

Eine neue Richtung nahm die bisher ausschließlich auf histologische Untersuchungen ausgerichtete Erforschung der Riesenfasern anfangs der Dreißigerjahre. Schon Friedländer (1889) hatte angenommen, daß die Aktivität der Riesenfasern zur Kontraktion des Hautmuskelschlauches führen würde. Aber erst mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden konnten Eccles, Granit und Young (1933), Bullock (1945), Rushton (1945), Kao und Grundfest (1957) die funktionellen Besonderheiten dieser Fasern aufzeigen. Da ist einmal die für die nicht saltatorisch leitenden Nervenfasern der Invertebraten ungewöhnlich schnelle Fort-

Leitung des Aktionspotentials mit einer Geschwindigkeit von bis zu 45 msec^{-1} , für die in erster Linie der große Durchmesser der Faser verantwortlich ist. Zweitens sind die Septen, die als Ort der Erregungsübertragung angesehen werden müssen, nicht polarisiert und leiten den elektrischen Strom praktisch ohne Verzug. Für die Riesenfasersepten des Regenwurms wurden weniger als 50 μsec berechnet. Beides erscheint im Zusammenhang mit der verhaltensphysiologischen Bedeutung des Riesenfasersystems bei der Fluchtreaktion des Tieres verständlich.

Die Riesenfasersepten werden als klassische Fälle elektrisch übertragender Synapsen betrachtet. Neben den genannten physiologischen Befunden sprechen einige widerstandserniedrigende morphologische Eigentümlichkeiten dafür, so die geringe Spaltbreite zwischen den Septalmembranen von nur rund $70 \text{ \AA}$, die große Fläche des Axonkontaktes und das Fehlen widerstandserhöhender Ausläufer von Glia-material im Septalspalt (Hama, 1959). Wie die funktionelle Polarisierung, so fehlt den Riesenfasersepten nach Hama (1959) auch die morphologische.

B) Zielsetzung

Den wesentlichen Anstoß zu einer erneuten elektronenmikroskopischen Untersuchung der Riesenfasersepten von Lumbriciden gaben zwei Umstände. Erstens schien die Abgrenzung der von Hama (1959) für Eisenia beschriebenen "vesicles" gegen die Vesikel chemisch übertragender Synapsen angezeigt, da sie im Widerspruch zu seinen Abbildungen zu stehen scheint. Zweitens erschien es im Hinblick auf die immer noch andauernde Kontroverse um die Vesikelhypothese der chemischen Übertragung (Robertson, 1964, 1970; Katz, 1969; Florey, 1970; Hubbard, 1971; Koelle, 1971; Nachmansohn, 1971) lohnend, die Frage nach der Spezifität der Vesikelpräsenz für chemische Synapsen an einer klassischen elektrischen Synapse zu testen; dies umso mehr, als Vesikel an Septen im Riesenfasersystem der Krebse bereits nachgewiesen sind (Furshpan und Potter, 1959; Hama, 1961; Pappas, Asada und Bennett, 1971; Stirling, 1972).

Weiterhin stellt sich die Frage, welche morphologischen Kriterien für eine elektrische Synapse als typisch gelten, und inwieweit die Riesenfaserseptonen damit übereinstimmen bzw. davon abweichen.

Nach neueren Untersuchungen scheint es sicher zu sein, daß die elektotonische Erregungsübertragung vermittels eines spaltüberbrückenden Kanalsystems geschieht, dessen morphologisches Erscheinungsbild mit "gap junction" bezeichnet wird. Charakteristisch sind physiologisch und morphologisch unpolarisierte Membranen, die mit einer Spaltbreite von nur 20-40 Å sehr eng assoziiert sind (Brightman und Reese, 1969; Pappas, Asada und Bennett, 1971).

Für die Mehrzahl der chemisch übertragenden Synapsen, die sowohl funktionell als auch strukturell polarisiert sind, gelten neben den präsynaptischen Vesikeln ein erweiterter Spalt von mehr als 200 Å Breite und spezifische paramembranöse Gebilde als charakteristisch. Von den letzteren wird den präsynaptisch gelegenen "dense projections" eine wichtige Rolle im Ausschüttungsmechanismus der Vesikel zugesprochen (z.B. Akert, 1971).

Wie die Resultate zeigen, sind die Riesenfaserseptonen der Lumbriciden Strukturen bisher unbekannter Komplexität und stimmen morphologisch nur teilweise mit dem derzeit als typisch betrachteten Bild einer elektrisch übertragenden Synapse überein.

MATERIAL UND METHODEN

Adulte Exemplare von Lumbricus terrestris und Eisenia foetida⁺ aus der Tierhandlung oder aus eigenen Fängen wurden nach zweiminütiger Betäubung in 1% Chloroformwasser (Staubesand, Kuhlo und Kersting, (1963) in Lumbricusringer (Adam und Czihak, 1964) präpariert. Das Einrollen der 1-1,5 cm langen Bauchmarkstücke bei der Fixierung läßt sich dadurch vermeiden, daß man es zusammen mit einem Stück Hautmuskelschlauch auf einen Korken feststeckt.

Die Fixierung der Präparate für die Elektronenmikroskopie erfolgte auf verschiedene Weise:

A) Normalfixierungen

- 1) Fixierung in 5% wäßriger, phosphatgepufferter Glutardialdehyd-Lösung (2 Std., 4°C). Nachfixierung in 2% OsO₄-Lösung in Phosphatpuffer nach Sörensen (Ruthmann, 1966) bei pH 7,4 (2 Std., 4°C).
- 2) Aldehydfixierung nach Karnovsky (1965) mit einem Gemisch aus Formaldehyd und Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (4,5 Std., Raumtemperatur). Nachfixierung in 1,33% OsO₄-Lösung in s-Collidinpuffer (2 Std., 4°C).
- 3) Osmiumfixierung nach Palade (1952): 2% OsO₄ in einem Puffergemisch aus Natriumazetat und Natriumveronal nach Michaelis (Ruthmann, 1966) bei pH 7,4 (2 Std., 4°C).
- 4) Kaliumpermanganat-Fixierung nach Luft (1959): 1,2% wäßrige KMnO₄-Lösung und Puffergemisch wie bei 3) im Verhältnis 1:1 (2 Std., im Eis-Wasser-Gemisch).

Mit Ausnahme der KMnO₄-Methode, bei der die großen cytoplasmatischen Räume der Riesenaxone vorwiegend schlecht erhalten waren, wurden mit den Fixierungen 1)-3) gute Ergebnisse erzielt. Fixierungsbedingte Unterschiede waren nicht zu beobachten.

⁺ Die Bestimmung der Arten wurde freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Otto Graff von der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig bestätigt.

Zur Entwässerung der Präparate diene die aufsteigende Äthanolreihe mit Propylenoxid am Schluß. Einbettung der Präparate zunächst für 12 Stunden in einem rotierenden Gemisch von Propylenoxid und Durcupan (FLUKA) im Mischungsverhältnis 1:1, anschließend Überführung in reines Durcupan (24 Std. bei 40°C und 48 Std. bei 60°C).

B) Spezielle histochemische Methoden

- 1) ZIO-Methode (Zinkjodid-Osmium) zur Darstellung synaptischer Vesikel nach Akert und Sandri (1968):
Fixierung wie A1): Zu 2 ml 2% OsO_4 -Lösung gibt man 6-8 ml filtrierter, frisch bereiteter Zn-J-Lösung der folgenden Zusammensetzung: 15 g Zinkpulver und 5 g kristallines Jod werden mit 200 ml Wasser zur Reaktion gebracht. Inkubationsdauer: 2 und 10 Stunden.
- 2) E-PTA-Methode (äthanolische Wolframatophosphorsäure) zur Darstellung synaptischer Kontaktstellen nach Bloom und Aghajanian (1966):
Fixierung wie A2), jedoch ohne Osmierung. Entwässerung bis 95% Äthanol, dann eine Stunde Inkubation in 1% Wolframatophosphorsäure in absolutem Alkohol mit Zusatz von 1-5 Tropfen 95% Äthanol auf 10 ml Lösung.
- 3) BIUL-Methode (Wismutjodid) zur Darstellung synaptischer Kontaktstellen nach Pfenninger (1971):
Fixierung wie A1). Imprägnierung: 0,5 g Wismutkarbonat, 2,5 g Kaliumjodid und 50 ml Ameisensäure werden auf etwa 50°C erhitzt, anschließend abfiltriert und abgekühlt. Die in Normalfixierung vorbehandelten Bauchmarksstücke bleiben 14,5 Stunden im Reaktionsgemisch.

Die Methoden B1-3) dienen der Charakterisierung besonderer Membranspezialisierungen, z.B. synaptischer Regionen. B1) liefert durch Schwärzung der klaren Vesikel eine Möglichkeit zu deren

Klassifizierung. B2) und B3) imprägnieren spezialisierte Zellkontakt selektiv.

4) Lanthanimprägnation zur Darstellung extrazellulärer Räume:

a) Lanthanimprägnation nach Overton (1968) verändert:

Fixierung: 5% Glutaraldehyd (Originalrezept: 2,5%) in 0,1 m Cacodylatpuffer und 1% $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (2 Std., Raumtemperatur); pH des Fixiergemischs: 7,4.

Waschen: 0,1 m Cacodylatpuffer mit 1% Lanthannitrat (2 Std. bei Raumtemperatur; (Originalrezept: 1 Std.).

Nachfixierung: 2% OsO_4 (2 Std., 4°C); (Originalrezept: 1% OsO_4 , 0,5 Std.).

Die Nachfixierung und alle folgenden Schritte werden ohne Lanthanzusatz ausgeführt.

b) wie a), jedoch: 0,2 m Cacodylatpuffer, 2% Lanthannitrat, wobei der Tracer allen Lösungen einschließlich der Osmiumsäure zugesetzt wurde. Weiterbehandlung wie a); pH des Glutaraldehydfixiergemischs: 7,15.

c) wie b), jedoch 0,1 m Cacodylatpuffer; 1% Lanthannitrat.

d) Lanthanimprägnation nach Revel und Karnovsky (1967):

Fixierung: Aldehydgemisch nach Karnovsky (1965), pH 7,5.

Waschen: 0,1 m Cacodylatpuffer. Nachfixierung: OsO_4 -s-Collidin (Karnovsky, 1965) mit 1% Lanthannitrat.

Ansatz: OsO_4 und 2% Lanthannitrat 1:1.

e) wie d), jedoch Zusatz von 1% Lanthannitrat zu allen Lösungen einschließlich der Alkoholreihe.

Mit Ausnahme von 4b) war die Gewebserhaltung in allen anderen Fällen gut. Keine der angewendeten Methoden erbrachte jedoch eine Imprägnation der extrazellulären Räume im Bauchmark des Regenwurms. In allen Fällen ist das feinstrukturelle Bild vergleichbar mit dem der Normalfixierung. Als Kontrolle für die Güte der verwendeten Lösungen diente bei 4e) ein Gewebe-

stück aus der Darmwand des Regenwurms, das die gewünschte Imprägnation der Interzellularräume zeigte.

Die Entwässerung und Einbettung erfolgte wie unter A) angegeben.

Zur lichtmikroskopischen Groborientierung eigneten sich mit Azur-II-Methylenblau (Richardson et al., 1960) oder mit Toluidinblau (0,1% in 2,5% Na_2CO_3) angefärbte Semidünnschnitte von 1-2 μm Dicke.

Die Ultradünnschnitte wurden 30 Minuten mit 2% wäßriger Lösung von Uranylazetat (Huxley und Zubay, 1961) und 4 Minuten mit Bleizitrat (Reynolds, 1963) kontrastiert.

Elektronenmikroskop: Zeiss EM 9S.

C) Iontophoretische Applikation von Procion Yellow zur Darstellung der transseptalen Permeabilität

Zur Anfärbung der Riesenaxone wurde der fluoreszierende Textilfarbstoff Procion Yellow M-4 RAN der Firma COLAB (Glenwood, Illinois, USA) in gesättigter Lumbricusringerlösung (ca 8%, 1 g Farbstoff auf 15 ml Ringer) verwendet und vor Gebrauch filtriert.

Versuchsanordnung (Abb.1):

In einer feuchten Kammer, bestehend aus Dentalwachs, das auf zwei Objektträger aufgeklebt wurde, tauchen 1,5-2 cm langen Bauchmarksstücke mit den Enden in zwei Vertiefungen mit Farbstofflösung. Das Bauchmarkmittelstück liegt zur Isolation in Paraffinöl. Nach Anlegen einer Spannung wandern die in Lösung anionischen Farbstoffmoleküle durch das Bauchmark in Richtung der positiven Anode. Nach Versuchsende werden die Bauchmarksstücke in Normalfixierung A1) ohne Osmierung fixiert, in Durcupan eingebettet und 5 μm dick geschnitten. Der Weg des Farbstoffs kann mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops im Gewebe verfolgt werden.

Versuchsdurchführung:

Versuchs-Nr.	Dauer	Temperatur	Spannung	Stromstärke	
				a	b ⁺
1	1 Std.	4°C	4,5 V	nicht gemessen	
2	10 min	Raumtemp.	4,5 V	nicht gemessen	
3	1 Std.	4°C	1,5 V	12 mA	6,5 mA
4	1 Std.	Raumtemp.	1,5 V	12 mA	7,5 mA
5	1 Std.	Raumtemp.	1,5 V	12 mA	8 mA
6	4,5 Std.	4°C	1,5 V	13,5 mA	2,2 mA

(⁺ Da keine unpolarisierbaren Elektroden verwendet wurden, ist der Abfall der Stromstärke zu Versuchsende (b) wahrscheinlich auf Polarisierungseffekte an den Elektroden zurückzuführen, (a) Versuchsbeginn).

Als Kontrolle dienen in Farbstofflösung gebadete Bauchmarksstücke (1 Std. bei 4°C; ca 1 Std. bei Raumtemperatur und 4,5 Std. bei 4°C). Die Eigenfluoreszenz des fixierten Gewebes wurde an einem nicht gefärbten Objekt getestet.

Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe eines Farbfilms Kodak Daylight High Speed Ektachrome EH 135-36 23 Din am Fluoreszenzmikroskop Ultraphot III der Firma Carl Zeiss, Oberkochen.

Die Versuche A1) und A2) wurden mit Lumbricus terrestris und Eisenia foetida, alle anderen nur mit Lumbricus terrestris durchgeführt.

Bei allen Größenangaben zur Topographie ist zu beachten, daß sich die Werte auf fixiertes Material beziehen und nach Günther (1971) etwa die Hälfte bis zwei Drittel der Werte am lebenden Tier betragen.

ERGEBNISSE

I) Topographie der Riesenfasersepten

Die Septen der drei dorsalen Riesenfasern der Regenwürmer befinden sich im hinteren Drittel der Ganglien etwa auf Höhe der Abzweigung der Seitennerven zwei und drei (Abb.2). Serien von Semischnitts zeigen, daß die unregelmäßig gewellten und mehr oder weniger stark eingefalteten Flächen der Septen schräg zur Transversalebene stehen (Abb.2b,3a). Die Septen der mittleren Riesenfaser verlaufen von rostroventral nach caudodorsal, die der beiden lateralen umgekehrt von caudodorsal nach rostroventral (Abb.2b oben). Letztere sind außerdem gegen die Sagittalebene geneigt (Abb.2b unten). Die Längenausdehnung von lateralen Septen mißt im Mittel 100-120 μm . Die medianen sind etwa doppelt so lang.

Im lichtmikroskopischen Bild sieht man, wie das Septum als feine Linie von Glia zu Glia quer durch die Faser zieht (Abb.2a,2c). Die Ansatzstellen zeigen keine besondere Strukturierung. Das elektronenmikroskopische Bild läßt das dicht an die Gliahülle angeschmiegte Axolemm der Riesenfaser erkennen. Am Ende eines Axonabschnitts biegt es zur Septenbildung abrupt von der Gliahülle weg zum Faserinneren hin um, ohne daß größere interzelluläre Lücken entstehen (Abb.3,19). Gelegentlich sitzt das Septum einem kleinen Gliawulst auf. Solche Gliavorsprünge treten auch im interseptalen Abschnitt der Riesenaxone auf.

Die zylindrische Axonhülle ist aus Myelinlamellen aufgebaut. Sie bestehen aus zwei dunklen Lagen von 75 $\text{\AA}$ und einer hellen Linie in der Mitte von ebenfalls etwa 75 $\text{\AA}$ Dicke. Die Wicklung der Lamellen ist mehr oder weniger dicht gepackt. Gelegentlich treten auch größere Lücken zwischen einzelnen Stapeln auf. Auffällig sind stellenweise auftretende desmosomenartige Verdickungen der Membranen. Hier verbreitert sich die Lamelle bis auf 450 $\text{\AA}$. Zwischen zwei Lamellen verläuft an solchen Stellen in der Mitte ein etwas heller grauer Streifen (Abb.3b).

In Übereinstimmung mit früheren Autoren (Stough, 1926; Günther, 1971) hat sich gezeigt, daß Septen mancher Körpersegmente fehlen können und daß dies besonders für die mittlere Riesenfaser zutrifft. In

einigen seltenen Fällen konnten Reste oder unvollständige Ausbildung von Septen beobachtet werden. In wenigen Ausnahmefällen finden sich Gliaresten im Spalt, niemals jedoch über die ganze Septenbreite, wie es von Taylor (1940) und Issidorides (1956) postuliert wurde.

Das Cytoplasma ist bei Anwesenheit des Septums bei beiden Arten auf der ventralen Seite in allen Fällen dichter als dorsal (Abb. 2c). Fehlt das Septum, ist dieser Unterschied nicht vorhanden. Das Cytoplasma der Fusionszone sieht völlig homogen aus.

II) Feinbau der Riesenfasersepten

A) Septalmembränen und Septalspalt

Wie bereits frühere elektronenmikroskopische Befunde zeigen, haben Zellmembranen eine trilaminare Grundstruktur, deren einheitliches Aussehen Robertson (1959) zur Formulierung des "unit membrane"-Konzepts bewog. Dieses Konzept hatte nicht nur den Vorteil, daß damit eine einheitliche Basis für alle Membranen geschaffen war, es schien darüber hinaus das Protein-Lipid-Protein-Modell von Danielli und Davson (1935) direkt sichtbar zu repräsentieren. Neuere Befunde zeigen allerdings, daß das trilaminare Erscheinungsbild nicht notwendigerweise mit dem Danielli-Modell übereinstimmen muß. Auch ist der Strukturierungsgrad biologischer Membranen, wie man u.a. seit Anwendung der Gefrierätztechnik weiß, sicher komplexer als es das trilaminare Modell beschreibt. Da aber der Begriff der "unit membrane" oder "Einheitsmembran" in der Literatur gebräuchlich ist, und das Modell mit Ergänzungen zur Interpretation der Septalmembranen ausreicht, dient es im folgenden als Grundlage der Feinstrukturanalyse.

1) Grundtyp

Das Septum aller drei dorsalen Riesenfasern besteht bei Lumbricus und Eisenia aus den Einheitsmembranen benachbarter Axone (vgl. Hama, 1959). Eine Einheitsmembran ist elektronenoptisch als dunkel-hell-dunkle Dreifachlinie gekennzeichnet, wobei die drei Zelllagen ziemlich gleich breit sind und zusammen etwa 100 Å messen.

Zwischen den Membranen bleibt ein Spalt von durchschnittlich 65 Å (40-85 Å) bei Eisenia und 75 Å (40-150 Å) bei Lumbricus (Abb.4).

Wie im folgenden gezeigt wird, weisen die Septalmembranen und ihre unmittelbare Umgebung häufig bis jetzt unbekannte Differenzierungen auf, die über das einfache Membrankonzept hinausgehen und auf eine besondere Funktion schließen lassen. Es handelt sich um Membranappositionen, "septierte" Spaltabschnitte im Querschnitt und ein hexagonales Muster im Flachschnitt. Weiterhin treten desmosomenartige Membranverdickungen und ausnahmsweise "dense projection"-artige Höcker im Querschnitt auf. In seltenen Fällen ist ein weiteres gitterartiges Flachschnittmuster zu beobachten.

2) Spezialisierungen

Bei beiden Regenwurmarten begleiten jeweils auf der cytoplasmatischen Seite membranständige, mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Höcker mäßig elektronendichten Materials weite Strecken des Septums (vgl. Hama, 1959). Diese Membranappositionen sind bei Eisenia ca 260 Å breit und 160 Å hoch. Sie treten in regelmäßigem Abstand von rund 340 Å (Mitte zu Mitte) auf (Abb.5c,5d). Bei Lumbricus sind vergleichbare Strukturen etwa 250 Å breit, 180-250 Å hoch und haben eine Periode von 300-350 Å (Mitte zu Mitte) (Abb.5a). Gelegentlich treten die Membranappositionen bei Eisenia dorsal stärker hervor als ventral. In vielen Fällen tritt zwischen den gegenüberliegenden Höckern im Septalspalt selbst ebenfalls eine Anhäufung mäßig elektronendichten Materials auf (Abb.5a,5c). Bei Lumbricus sind zwischen gegenüberliegenden Membranappositionen im Septalspalt an einigen Stellen dunkle Querbanden so deutlich ausgeprägt, daß sie mit "septate junctions" vergleichbar sind (z.B. Wood, 1959; Locke, 1965; Wiener, Spiro und Loewenstein, 1964; Bullivant und Loewenstein, 1968). Die dunklen Banden messen 100-250 Å, die hellen Zwischenräume sind ebenfalls 100-250 Å breit (Abb.5b). Die Membranen sind häufig zwischen zwei Banden zum Cytoplasma hin vorgewölbt. In einigen Beispielen findet man bei Eisenia ebenfalls eine

deutliche "Septierung" des Spalts. Die dunklen Banden ergeben zusammen mit den Membranappositionen stiftförmige Gebilde, die das Septum durchsetzen (Abb.5d). Eine Übersicht über den Septenquerschnitt zeigen die Abb.19E,19C.

Führt man einen Schnitt parallel zu den Septalmembranen durch den Septalkomplex, zeigt sich an einem medianen Septum bei Eisenia, daß sich das schwach elektronendichte Spaltmaterial zu einem mehr oder weniger regelmäßigen, hexagonalen Wabenmuster strukturiert (Abb.6a). Trifft man die Membranen, erhält man ein unstrukturiertes, elektronendichtes Bild (Abb.6b*). (Von Lumbricus liegen für E-PTA-Imprägnation Flachschnitte vor). Die runden bis ovalen dunklen Flecken des Flachschnitts messen im Mittel $250 \text{ \AA}$ ($200\text{--}350 \text{ \AA}$), der helle Zwischenraum etwa $100 \text{ \AA}$ ($65\text{--}125 \text{ \AA}$). Bei einem Schrägschnitt dessen Richtung stärker von der Ebene der Septalmembranen abweicht, erscheint ein hell-dunkles Streifenmuster, mit einem dunklen Anteil von $180\text{--}250 \text{ \AA}$ und einem hellen von $100\text{--}200 \text{ \AA}$. Die Maße stimmen im Prinzip mit den Daten aus Querschnitten von Eisenia und Lumbricus überein (Abb.6b).

Eine weitere Differenzierung des Septums, die bei beiden Arten auftritt, sind desmosomenartige Membranverdickungen, die "intermediate junctions" (Farquhar und Palade, 1963; Reinert und Ursprung, 1971), von bis zu $200 \text{ \AA}$ Stärke und mit unstrukturiertem, mäßig elektronendichtem Material im leicht erweiterten Spalt. Sie treten in unregelmäßigen Abständen auf und sind bis zu $0,6 \text{ \mu m}$ lang (Abb.7a,7b).

Sowohl bei Lumbricus als auch bei Eisenia sind außer den eben genannten Strukturen in je einem einzigen Beispiel auffällige cytoplasmatische, kegelförmige bis rundliche Membranvorsprünge zu beobachten, die nur einseitig, bei Eisenia ventral, bei Lumbricus dorsal, liegen. Besonders diejenigen von Lumbricus ähneln in Größe und Habitus den "dense projections" chemisch übertragender Synapsen (Pfenniger, 1973). Die Höhe beträgt $530\text{--}700 \text{ \AA}$, die Breite an der Basis $700\text{--}1200 \text{ \AA}$ für Lumbricus. Bei Eisenia ist die Höhe $200\text{--}400 \text{ \AA}$, die Breite an der Basis ca $300 \text{ \AA}$, der Abstand Mitte zu Mitte etwa $550 \text{ \AA}$ (Abb.7c,7d).

An einer flach geschnittenen medianen Synapse von Lumbricus konnte in weniger Beispielen ein Gitterwerk aus rundlichen bis vieleckigen

Einheiten beobachtet werden. Die hellen Lumina der Vielecke messen im Durchschnitt bis 500 Å, die elektronendichten Wände bis zu 100 Å (Abb.6c).

Während das Axoplasma im interseptalen Abschnitt relativ strukturarm ist, häufen sich in Septennähe Ansammlungen von Mitochondrien (Abb.15).

B) Cytochemie des Septalkomplexes

1) E-PTA-Imprägnation

Wie Bloom und Aghajanian (1966) mit Hilfe der E-PTA-Methode gezeigt haben, zeichnen sich spezialisierte Zellkontakte wie chemisch übertragende Synapsen im Gegensatz zu nicht spezialisierten durch eine besondere Ausgestaltung des Membranbelages aus, die mit Standardfixierung nur teilweise nachzuweisen ist.

An allen drei Riesenfasersepten findet man bei Lumbricus Strukturen, die den mit Normalfixierung gefundenen "intermediate junctions" ähneln. Sie treten über den gesamten Septenquerschnitt auf. Ihr Aufbau ist wie folgt: Nicht imprägnierte, helle Axonmembranen (45-75 Å) werden flankiert von breiten, bandförmigen und stark elektronendichten Membranbesätzen, die unregelmäßig ausgefranst in das Cytoplasma übergehen. Ihre Dicke ist unterschiedlich, von 75-150 Å bzw. 180-270 Å in einem anderen Beispiel (Abb.8b,8c). Zwischen den cytoplasmatischen Membranbelägen fällt eine wiederum durch einen hellen Spalt getrennte Doppellinie auf ("intracleft lines", Akert,1971). Sie repräsentiert die extrazellulären Membranbeläge. Alle drei Linien sind etwa gleich breit, sie messen 22-30 Å (Abb.8b,8c).

Bei lateralen Riesenfasersepten findet man gelegentlich "intermediate junctions" in der Nähe der Gliascheide perlschnurartig angeordnet (Abb. 8a). Die Analyse eines solchen Septums ergibt: Randnah treten in relativ regelmäßigen Abständen 13 Verdickungen auf der einen, 4 auf der anderen Seite auf, die durch nicht verdickte Membranabschnitte getrennt werden. Die Länge dieser als "intermediate junctions" angesprochenen Verdickungen beträgt 750-2600 Å. Die Gesamtlänge des Septums ist hier 37,4 µm, davon sind 2,6 µm oder 7% "intermediate junctions".

Ein von den "intermediate junctions" abweichender Typ von Membranspezialisierungen ist für mediane und laterale Riesenfasersepten bekannt.

Schmale "internal fuzz coats" (40-80 Å) an einem medianen Septum tragen Höcker (Breite an der Basis: 135-250 Å, Höhe: 125-190 Å, Abstand Mitte zu Mitte: 250-310 Å, die den Membranappositionen aus der Normalfixierung nach Habitus und Elektronendichte gleichen (Abb.9a, vgl. Abb.5). Bei einem lateralen Septum beträgt die Bandbreite des "internal fuzz coat" 20-50 Å. Die Höhe der Höcker ist 115-145 Å, in Ausnahmefällen bis 285 Å, die Breite an der Basis 145-190 Å, ausnahmsweise bis 285 Å. Der Abstand Mitte zu Mitte beläuft sich auf etwa 280 Å, in einem Fall auf ca 570 Å (Abb.8d).

Im Bereich der hier hellen Septalmembranen kann man stellenweise eine diffuse Graufärbung erkennen. Sie läßt sich jedoch nur in einigen Fällen zwischen zwei Membranappositionen lokalisieren (Abb.8d,9a).

Die Verbindungsstruktur zwischen den "intermediate junctions" besteht aus zwei Lamellen (35-70 Å), die durch einen Spalt von etwa 140 Å getrennt sind. Es handelt sich um die Weiterführung der "intracleft lines", die hier allerdings durch einen weiteren Spalt getrennt sind (Abb.8a,8c).

Zwischen der dorsalen und der ventralen Seite eines Septenquerschnitts ist kein morphologischer Unterschied hinsichtlich der Struktur der Membranbeläge zu erkennen; lediglich der schon erwähnte Unterschied in der Dichte des Axoplasmas in Membrannähe ist auch hier gelegentlich feststellbar.

Der Tangentialschnitt durch ein E-PTA-blockimprägniertes medianes Septum von Lumbricus enthüllt eine mit dem Muster der Normalfixierung vergleichbare hexagonale Anordnung mäßig elektronendichter Elemente. Unterschiede zu den Befunden mit Normalfixierung bestehen jedoch darin, daß das Bauelement des hexagonalen Musters annähernd hexagonal gebaut und in sich strukturiert ist. Die Wabengröße beträgt durchschnittlich 200 Å (170-230 Å). Gelegentlich ist eine dunklere Wand (ca 25 Å) und im Zentrum ein dunkler Punkt von etwa 25 Å zu beobachten (Abb.8a). Der Abstand von Mitte zu Mitte zwischen zwei Einheitszellen beläuft sich auf 280-290 Å. Das Muster ist hier wie auch in den Querschnitten um ca 15% engmaschiger als nach Normalfixierung.

2) BIUL-Imprägnation

Die Analyse der Daten der BIUL-Imprägnation gibt im wesentlichen das gleiche Bild wie mit E-PTA: Keine Imprägnation der Membranen, stark ausgeprägte und elektronendichte Membranauflagerungen und die jodophile Doppellamelle im Spalt. Die dem Cytoplasma zugekehrten "internal fuzz coats" sind bei dieser Imprägnierung noch stärker ausgeprägt als nach E-PTA-Behandlung. Ihre Breite beträgt bis zu $420 \text{ \AA}$, sie erstrecken sich bis zu $0,7 \text{ \mu m}$. Die hellen Membranen belaufen sich auf $45-75 \text{ \AA}$, die drei Linien im Spalt ("intracleft lines") auf je etwa $30 \text{ \AA}$ (Abb.10a,10b).

Stärker ausgeprägt ist hier auch die Abweichung der "internal fuzz coats" von der Bandstruktur. Zum Teil erscheinen sie sogar unterbrochen und sehen wie "dense projections" aus (Breite an der Basis: bis $670 \text{ \AA}$, Höhe: $400 \text{ \AA}$) (Abb.10c,10d). Kleinere höckerartige Gebilde, vergleichbar den Membranappositionen der Normalfixierung und nach E-PTA-Behandlung, sind mit dieser Methode nicht aufgetreten. Die Abb.11 zeigt in schematischer Form einen Vergleich der Imprägnationsmuster von spezialisierten Abschnitten des Septums und chemischen Synapsen.

3) Lanthanimprägnation

Der Versuch den interzellulären Spalt der Septen der dorsalen Riesenfasern mit Lanthannitrat zu imprägnieren, zeigt im Gegensatz zum Kontrollversuch am Darmepithel ein negatives Ergebnis. Der Interzellularraum zwischen Zellen des Darmepithels ist an einigen Stellen intensiv schwarz markiert (Abb.12b). Eine schwächere, diffuse Imprägnierung tritt im Cytoplasma der Epithelzellen auf. Ovale, lamellierte Körper erscheinen negativ imprägniert (Abb.12b).

Betrachtet man dagegen die Verhältnisse beim Nervengewebe, so kann man in keinem Falle, weder im Neuropil des Bauchmarks, noch im synaptischen Spalt der Septen der dorsalen Riesenfasern eine Schwärzung der extrazellulären Räume beobachten (Abb.12a). Vom Gesamteindruck

her ergibt sich ein Bild, das dem der Normalfixierung mit Vesikelansammlungen, "intermediate junctions", "septierten" Abschnitten mit Membranappositionen, ohne Unterschied in den Größenverhältnissen, vergleichbar ist.

Dies gilt für alle angewendeten Verfahren der Lanthanimprägnation.

C) Rekonstruktion des Septalkomplexes

Von allen Spezialisierungen des Septalkomplexes lassen sich nach den vorliegenden Befunden nur den Regionen, die Membranappositionen und einen "septierten" Spalt aufweisen, ein bestimmtes Flachschnittmuster zuordnen (vgl. Abb. 5, 6, 8d, 9). Die prinzipielle Übereinstimmung der Größenverhältnisse bei den fraglichen Strukturen legt die Möglichkeit nahe, durch Kombination der Ergebnisse eine schematische Darstellung der speziellen Geometrie des Septalkomplexes an solchen Stellen zu entwerfen. Die Resultate sind in der Tabelle 1 und der Abb. 13. zusammengestellt.

Tabelle 1:

	<u>Lumbricus</u>		<u>Eisenia</u>
	Normalfixierung	E-PTA	Normalfixierung
a) Querschnitt:			
Membranappositionen:			
Höhe:	180-250 Å	115-190 Å	ca 160 Å
Breite:	ca 250 Å	135-250 Å	ca 260 Å
Streifenmuster:			
hell:	100-250 Å		ca 100 Å
dunkel:	100-250 Å		ca 260 Å
Abstand Mitte zu Mitte:	300-350 Å	ca 280 Å	ca 340 Å
b) Tangentialschnitt:			
Einheitszelle:		ca 200 Å	ca 250 Å
Abstand Mitte zu Mitte:		280-290 Å	ca 350 Å

III) Vesikel

A) Topographie und Feinstruktur

In allen drei Riesenfasersepten von Lumbricus und Eisenia lassen sich Vesikel nachweisen, die den Vesikeln chemisch übertragender Synapsen morphologisch gleichen. Sie liegen in dicht gepackten Haufen eng zusammen, selten einzeln, und auf beiden Seiten des Septums entweder einander gegenüber, was besonders bei der medianen Riesenfaser vorkommt, oder räumlich getrennt. In vielen Fällen besteht eine räumliche Korrelation zwischen Vesikelanhäufungen einerseits und Membranverdickung sowie Spalterweiterung von rund 75 Å auf bis zu 180 Å andererseits. Wenn diese Vergesellschaftung auch nicht obligatorisch ist, so bleibt ihr häufiges Auftreten in etwa drei Viertel aller Fälle dennoch bemerkenswert (Abb. 14,15).

Im Gegensatz zu den von Hana (1959) beschriebenen membranständigen "vesicles" bei Eisenia sind diese Vesikel von einer Einheitsmembran umgeben (Abb.14a). Ihr Inhalt ist bei den angewendeten Normalfixierungs- und Kontrastierungsverfahren von geringer Elektronendichte. Nur wenige Vesikel haben einen dunklen Kern und sind deshalb als "dense core vesicles" anzusprechen (Abb.14,15). Der Anteil der "dense core vesicles" beträgt bei Lumbricus für die Summe aller Vesikel von dorsal und ventral für mediane und laterale Riesenfasersepten etwa 18%. Bei Eisenia ist der Wert für dorsale und ventrale Vesikel ebenfalls gleich und liegt mit 10% etwas niedriger als bei Lumbricus, gemessen an einer medianen Riesenfaser.

B) Cytochemie der Vesikel

ZIO-Imprägnation

Synaptische Vesikel an chemisch übertragenden Synapsen lassen sich mit Zinkjodid-Osmium elektronendicht imprägnieren (Lit: Pfenninger,

1973). Bei einer zweistündigen Inkubation des Bauchmarks im ZIO-Gemisch ist keine Schwärzung des Vesikelinhalts zu beobachten. Gelegentlich tritt eine etwas stärkere Grautönung des Vesikelinhalts auf. Ein Versuch mit 10 Stunden Inkubationsdauer brachte im Prinzip keine Änderung; lediglich in einem Beispiel weisen die ventral gelegenen Vesikel eine etwas stärkere Graufärbung im Vergleich zur Normalfixierung auf. Ab und zu kann eine geringe Deformation der Vesikel durch Abplattung bzw. Eindellung beobachtet werden (Abb.16).

C) Statistik der Vesikelgrößen

Die statistische Erfassung der Durchmesser von 1038 Vesikeln, 500 von der ventralen und 538 von der dorsalen Seite, zweier Septen der medianen Riesenfaser von Lumbricus ergibt, daß ihr Mittelwert bei den einzelnen Anhäufungen zwischen 500 Å und 700 Å schwankt und für die Gesamtheit der dorsal gelegenen Vesikel mit 560 Å etwas kleiner ist als für die ventralen mit 599 Å (t-Test, $p < 0,001$)⁺. Läßt man die "dense core vesicles" außer Acht, so haben 440 dorsale Vesikel einen mittleren Durchmesser von 530 Å, 418 ventrale einen mittleren Durchmesser von 570 Å.

Als Maß für die Vesikeldichte einer vollständigen Population, die anhand von Querschnitten gewonnen wurde, ist deren Zahl auf $1 \mu\text{m}^2$ berechnet. Sie bestimmt sich zu 3900.

Obwohl die Mittelwerte der Summe der Vesikeldurchmesser aller dorsaler und ventraler Populationen signifikant verschieden sind, gilt dies nicht für alle Einzelvergleiche: Von insgesamt 153 möglichen Vergleichen, wovon 81 dorsal:ventral-Vergleiche sind, sind 50 signifikant verschieden. 17 der signifikant unterschiedlichen Vergleiche sind dorsal:dorsal, 11 ventral:ventral und 22 dorsal:ventral. Bei den letzteren sind immer die dorsalen Vesikel kleiner als die ventralen. Von den sieben paarigen Vesikelhaufen sind drei (2:13, 3:14, 7:18) signifikant unterschiedlich. Bei den vier restlichen kommt in einem Fall (1:12) die einzige Ausnahme vor, daß in den paarigen Haufen die

⁺ Die Prüfung auf Normalverteilung in diesem und allen anderen Beispielen erfolgte graphisch auf halblogarithmischem Papier.

ventralen Vesikel kleiner sind als die dorsalen (Tabelle 2, t-Test zu Tabelle 2).

Bei den Einzelhaufen (zwei dorsale und zwei ventrale) weichen die mittleren Durchmesser für ventrale Vesikel mit 601 Å und 595 Å nicht vom Gesamtmittelwert von 599 Å ab. Dagegen liegen beide Werte der dorsalen Vesikelhaufen mit 587 Å und 636 Å (dem größten Wert für Einzelhaufen überhaupt) über dem des Gesamtmittelwertes von 560 Å und über den Mittelwerten für dorsal- Einzelanhäufungen aus paarigen Populationen (Tabelle 2). Dies rührt teilweise daher, daß der Anteil an "dense core vesicles" in beiden Fällen überdurchschnittlich hoch ist, mit etwa einem Drittel im ersten und etwa der Hälfte der Gesamtzahl im zweiten Fall. Zieht man die Daten für "dense core vesicles" ab, so ergibt sich eine Erniedrigung von 587 Å auf 537 Å und von 636 Å auf 569 Å. Der letzte Wert liegt immer noch über dem Durchschnitt für Vesikelhaufen ohne "dense core vesicles" von 530 Å.

Bei der Auswertung von vier ventralen (n=218) und drei dorsalen (n=96) Einzelhaufen der lateralen Riesenfasern von Lumbricus zeigen der Summenmittelwert (585 Å) und die Einzelhaufendaten für ventrale Vesikel keinen signifikanten Unterschied zur medianen Riesenfaser. Die Einzelwerte für dorsale Vesikelhaufen streuen stärker (Tabelle 2). Der Mittelwert hieraus bleibt mit 520 Å signifikant unter dem Durchschnitt für dorsale Vesikel an medianen Riesenfasern.

Von 21 möglichen Einzelvergleichen, wovon 12 dorsal:ventral-Vergleiche sind, erweisen sich 7 als signifikant unterschiedlich. 1 Vergleich ist dorsal:dorsal, 6 sind dorsal:ventral. In allen Fällen sind die ventralen Vesikel größer (Tabelle 2, t-Test zu Tabelle 2).

Die Besetzungszahl der ausgewerteten Vesikelhaufen schwankt auf der ventralen Seite von 18-124, auf der dorsalen von 10-114 Vesikel pro Anhäufung. Die mittlere Besetzungszahl an den medianen Riesenfasersepten für ventrale Haufen beträgt 56, für dorsale 60 Vesikel, für mediane und laterale Septen zusammen: ventral 55 und dorsal 53 Vesikel. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Im Gegensatz zu Lumbricus stellte sich bei Eisenia heraus, daß bei Auswertung von 10 ventralen (n=331) und 4 dorsalen (n=97) Vesikelansammlungen an einer medianen Riesenfaser die ventralen Vesikel im Mittel kleiner sind als die dorsalen. Der Unter-

schied ist nicht signifikant. Dabei stimmen die Mittelwerte für dorsale Vesikel mit 558 Å für Eisenia gegenüber 560 Å bei Lumbricus überein. Die ventralen bleiben dagegen im Mittel mit 514 Å signifikant kleiner als vergleichbare (599 Å median, 585 Å lateral) bei Lumbricus.

Im Einzelvergleich sind von 91 möglichen Fällen, wovon 40 dorsal:ventral-Vergleiche sind, nur 3 signifikant unterschiedlich. Alle 3 sind dorsal:ventral-Vergleiche mit ausschließlich größeren dorsalen Vesikeln (Tabelle 3, t-Test zu Tabelle 3).

Zusammenfassend läßt sich feststellen: Bei Eisenia sind 7,5% (3 von 40) der Einzelhaufenvergleiche zwischen dorsal und ventral signifikant unterschiedlich, zugunsten größerer dorsaler Vesikel. Bei Lumbricus zeigen umgekehrt median 27% (22 von 81) und lateral 50% (6 von 12) der Einzelhaufenvergleiche zwischen dorsal und ventral größere ventrale Vesikel. Darüberhinaus ist hier die Summe aller ventralen Vesikel signifikant größer als die der dorsalen.

Die Verteilung der Vesikel beider Regenwurmart nach Größenklassen ist aus Tabelle 4 ersichtlich. Mehr als die Hälfte aller Vesikel liegen zwischen 500 Å und 600 Å (Tabelle 5)⁺. Die Werte aus den Tabellen 2 und 3 sind in den Histogrammen der Abb.17, die der Tabelle 4 in den Histogrammen der Abb.18 graphisch dargestellt.

Die Verteilung von Vesikelansammlungen über den Septenquerschnitt einer medianen Riesenfaser zeigt die Abb.19A.

Tabelle 2:

Mittlere Vesikeldurchmesser aus Summen- und Einzelhaufenmessungen von Lumbricus terrestris in (Å):

Lfd. Nr. der Vesikelhaufen:	mediane Riesenfasersepten:	1-18
	laterale Riesenfasersepten:	19-25

⁺ Bei der Klasseneinteilung der ventralen Vesikel der lateralen Riesenfasern von Lumbricus liegt ein anderer Einteilungsmodus zugrunde als bei den übrigen.

DORSAL					VENTRAL				
Nr.	n	$\bar{x}$	s	m	Nr.	n	$\bar{x}$	s	m
					10	23	601	70	15
					11	124	595	71	6
1	40	516	83	13	12	40	502	105	17
2	65	499	84	10	13	59	564	102	13
3	79	565	80	9	14	18	583	48	11
4	10	550	77	24	15	41	605	86	13
5	45	564	74	11	16	32	690	116	13
6	62	565	87	12	17	52	621	126	18
7	68	535	99	12	18	61	564	90	12
8	114	587	101	10					
9	55	636	93	13					
19	22	591	100	10					
20	28	484	119	25					
21	46	507	95	14					
					22	50	607	128	19
					23	14	547	89	24
					24	64	575	114	14
					25	90	580	128	14
SVD _{me}	538	560	97	4		500	599	107	5
SVD _{me}	440	530	70	3		418	570	85	4
-d.c.v.									
SVD _{la}	96	520	100	10		218	585	122	8

Extremwerte	DORSAL		VENTRAL	
	MEDIAN/LATERAL		MEDIAN/LATERAL	
Größter Wert:	606	581	690	607
Kleinster Wert:	403	414	502	574

Zeichenerklärung:

n = Anzahl der gemessenen Vesikeldurchmesser

$\bar{x}$ = mittlerer Vesikeldurchmesser in ($\bar{A}$)

s = Standardabweichung des Mittelwerts

m = Standardfehler des Mittelwerts

SVD_{me} = Summe aller gemessenen Vesikeldurchmesser median

SVD_{me} = Summe aller gemessenen Vesikeldurchmesser median, ohne
-d.c.v. "dense core vesicles"

SVD_{lat} = Summe aller gemessenen Vesikeldurchmesser lateral

Statistischer Vergleich der Summen- und Einzelhaufenwerte aus Tabelle 2:

Lumbricus terrestris, mediane Riesenfasersepten (t-Test, $p < 0,001$)

Vergleich Nr.	n $\bar{u}$	t
1: 8	152	3,9916
1: 9	93	6,5440
1:13	79	4,7694
1:14	120	8,5043
1:15	90	4,5923
1:17	61	4,1179
1:18	162	5,8633
2: 3	142	4,8197
2: 5	108	4,1918
2: 6	125	4,3233
2: 8	177	5,9241
2: 9	118	8,5315
2:11	122	3,8737
2:12	81	4,0765
2:13	104	6,3025
2:14	145	11,1789
2:15	115	6,2901
2:16	124	
2:17	86	
2:18	187	
3: 9	132	
3:10	117	
3:14	159	
4:14	90	
5: 9	98	
5:14	142	

6: 9	115	4,3311
6:14	142	7,1422
7: 8	180	3,3703
7: 9	121	5,8390
7:13	107	3,7830
7:14	148	8,2753
7:15	118	4,2207
7:18	190	4,8452
8:10	152	4,5426
8:14	194	6,6392
9:10	93	6,6411
9:11	112	3,9941
9:16	114	4,3091
10:13	79	4,8902
10:14	120	8,7081
10:15	90	4,8667
10:17	61	4,0464
10:18	162	6,3763
11:14	139	6,2772
12:14	98	3,8245
13:14	121	4,1507
14:16	141	7,0949
14:17	103	3,5204
14:18	204	7,3080
SVD dorsal:ventral	1036	6,0021
SVD dorsal:ventral -d.c.v.	856	7,5111

Statistischer Vergleich der Summen- und Einzelhaufenwerte aus Tabelle 2:

Lumbricus terrestris, laterale Riesenfasersepten (t-Test, $p < 0,001$)

Vergleich Nr.	nü	t
19:20	48	4,1306
20:22	40	3,8759
20:23	76	4,7918
20:24	90	3,9927
20:25	116	3,8195
21:23	94	4,3331
21:25	134	3,4155
SVD dorsal:ventral	312	4,5898

Tabelle 3:

Mittlere Vesikeldurchmesser aus Summen- und Einzelhaufenmessungen von Eisenia foetida in (Å):

Lfd. Nr. der Vesikelhaufen: medianes Riesenfaserseptum: 1-14

DORSAL					VENTRAL				
Nr.	n	$\bar{x}$	s	m	Nr.	n	$\bar{x}$	s	m
1	6	521	110	45					
2	8	547	73	26					
3	62	570	79	101					
4	21	467	213	46					
					5	56	492	101	13
					6	25	538	92	18
					7	11	563	40	119
					8	37	559	121	20
					9	40	486	96	15
					10	38	561	107	17
					11	22	523	71	17
					12	25	528	68	14
					13	26	539	66	13
					14	51	511	79	110
SVD _{med} 97		558	82	84		331	514	95	52

Extremwerte	DORSAL	VENTRAL
Größter Wert:	570	563
Kleinster Wert:	467	486

Zeichenerklärung wie Tabelle 2.

Statistischer Vergleich der Summen- und Einzelhaufenwerte aus Tabelle 3:
Eisenia foetida, medianes Riesenfaserseptum (t-Test, $p \leq 0,001$)

Vergleich Nr.	n	t
3: 5	116	4,6651
3: 9	100	4,7963
3:14	111	3,9159

Tabelle 4:

Häufigkeitsverteilung der Vesikel auf die vorkommenden Größenklassen (GK):

GK	<u>Lumbricus terrestris</u>				<u>Eisenia foetida</u>	
	Anzahl				Anzahl	
	median	lateral			median	
	dorsal	ventral	dorsal	ventral ⁺	dorsal	ventral
2	-	3	-		3	-
2,5 (2,4) ⁺	1	3	1	2	7	-
3 (3,2)	11	8	5	16	23	3
3,5	62	18	30		45	9
4 (4,0)	160	88	32	70	98	24
4,5	137	139	9		97	32
5 (4,8)	85	134	8	82	37	17
5,5 (5,6)	41	36	4	22	10	9
6	29	37	5		8	3
6,5 (6,4)	7	21	2	16	1	-
7 (7,2)	4	13	-	10	-	-
7,5	1	-	-		-	-

Übertragung der Größenklassen in $\bar{A}$:

GK:	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5
$\bar{A}$:	250	313	375	438	500	563	625	688	750	813	875	938
GK: ⁺	2,4	3,2	4	4,8	5,6	6,4	7,2					
$\bar{A}$:	300	400	500	600	700	800	900					

Tabelle 5:

Anteil der Vesikel an den beiden am stärksten besetzten Größenklassen:

		Häufigkeit	Vesikeldurchmesser
	dorsal	55% (297)	500-563 Å
<u>Lumbricus:</u>	median		
	ventral	55% (273)	563-625 Å
	dorsal	65% (62)	438-500 Å
<u>Lumbricus:</u>	lateral		
	ventral	70% (152)	500-600 Å
	dorsal	59% (195)	500-563 Å
<u>Eisenia:</u>	median		
	ventral	58% (56)	500-563 Å

IV) Transseptale Permeabilität

Procion Yellow-Iontophorese

Die iontophoretische Applikation des Textilfarbstoffs Procion Yellow gelang am besten nach Inkubation von einer Stunde Dauer bei Raumtemperatur. Kontrollversuche in der Kälte führten zu unregelmäßiger Farbstoffverteilung und weniger gut erhaltenem Gewebe. Das Axoplasma der Riesenfasern erscheint in solchen Fällen körnig bis verklumpt. In seltenen Fällen und in weniger starkem Ausmaß kommt eine unregelmäßige Farbstoffverteilung auch in der Wärme vor. In Versuchen ohne elektrisches Feld drang an den Schnittenden des Präparats ebenfalls Farbe ins Bauchmark ein, allerdings über kürzere Strecken.

Die leuchtend gelbe Fluoreszenz von Procion Yellow taucht in allen Regionen des Bauchmarks einschließlich der äußeren Gliahülle auf. Die Imprägnation des Axoplasmas der dorsalen Riesenfasern ist im Farbton gedämpfter und schwach orange, wie auch die Hauptmasse des Neuropils. In der medianen Riesenfaser, seltener in den lateralen, kann das Axoplasma gelegentlich geschrumpft sein. Nicht angefärbte Zellbereiche, wie z.B. die Gliahüllen der Riesenfasern, und Kontrollpräparate ohne Procion Yellow bleiben grün (Abb.20,21).

Die transseptale Permeabilität des Farbstoffs läßt sich für mediane und laterale Riesenfasern nachweisen. Der eingeschleuste Farbstoff hinterläßt jenseits des Septums eine zwar schwache, aber deutlich nachweisbare Fluoreszenz, die auf den Durchtritt von Farbstoffmolekülen durch die Septen schließen läßt. Die Abb.20 zeigt Ausschnitte aus dem Verlauf eines medianen Septums von etwa 200 μm Länge.

Wie an den lateralen Septen gezeigt, nimmt mit zunehmender Entfernung von der Eintrittsstelle des Farbstoffs die Fluoreszenz in allen Bereichen des Bauchmarks ab (Abb.21a,21b). In Abb.21b ist der Eintritt der Kollateralen in die rechte laterale Riesenfaser zu sehen. Obwohl die Fluoreszenz wegen der größeren Entfernung vom Beginn des Präparates schwächer geworden ist (Tabelle 6), ist der Unterschied zwischen der Farbstoffkonzentration im dorsalen (auslaufenden) und ventralen (neu hinzukommenden) Axonanteil deutlich festzustellen. Im Vergleich dazu zeigt die Abb.21c die grüne Eigenfluoreszenz des nicht angefärbten Gewebes.

Die Septen selbst sind bei diesem Verfahren nur dann als Linien etwas heller gelber Fluoreszenz zu erkennen, wenn die Farbstoffkonzentration nicht zu stark ist, wie es bei den lateralen Riesenfasern der Fall ist.

Alle Abbildungen stammen aus einer Schnittserie des Versuches 4 von insgesamt 2655 μm Länge. Die Applikation des Farbstoffs erfolgte von posterior nach anterior; zur Lage der Septen vgl. Abb.2b. Die folgende Aufstellung zeigt, aus welchen Axonregionen die Abbildungen entnommen sind.

Tabelle 6:

Medianes Riesenfaserseptum

Abb.Nr.	Abstand zum Septenanfang	Abstand zum Beginn der Schnittserie
20a	0 μm , unmittelbar vor Septenbeginn	250 μm

20b	75 μm , mittlere Septen- region	325 μm
20c	125 μm , Endregion	425 μm

Laterales Riesenfaserseptum

Abb.Nr.	Abstand zum Septenanfang	Abstand zum Beginn der Schnittserie
21a	40 μm , rechtes Septum Anfangsregion	1685 μm
21b	110 μm , rechtes Septum Ende	1755 μm

V) Mikrotubuli und Neurofilamente

Die lichtmikroskopisch darstellbaren Neurofibrillenzüge in der Septenregion der Riesenfasern können bei Lumbricus zum ersten Mal elektronenmikroskopisch bestätigt werden. Im Querschnitt erscheint dorsal und ventral in Septennähe ein zentral gelegenes ovales Feld aus Neurofilamenten und Mikrotubuli (Abb.22a). Die maximale Ausdehnung eines solchen Feldes betrug 22 mal 9 μm , gemessen an einer lateralen Riesenfaser von 50 μm Durchmesser. Daneben kommen kleinere Felder (z.B. 5 mal 2 μm) vor. Kurz vor dem Septum erreicht das Feld seine größte Ausdehnung und verschwindet, ohne Kontakt mit den Septalmembranen aufgenommen zu haben (Abb.3a). Mikrotubuli und Neurofilamente treten auch dann auf, wenn kein Septum ausgebildet ist.

In Horizontalschnitten parallel zur Längsachse der Riesenfaser läßt sich ein in der Mitte der Faser verlaufendes, gewundenes Band unterschiedlicher Breite aus parallelen Neurofilamenten und Mikrotubuli bis etwa 5 μm vor das Septum verfolgen. Seine Länge mißt in einem Beispiel ca 45 μm . Das Fibrillenband verläßt kurz vor dem Septum seine zentrische Lage und fächert sich etwas auf, jedoch nicht so weitgehend wie in lichtmikroskopischen Präparaten (Smallwood und Holmes, 1927). Es endet im Cytoplasma, ohne mit der Septalmembran in Verbindung zu treten (Abb.3a).

Die Neurofilamente messen im Mittel 50 Å. Mikrotubuli kommen vereinzelt ($\varnothing$ bis 160 Å) und in Bündeln ($\varnothing$ bis 250-300 Å) vor. Gelegentlich haben sie einen dunklen Kern (ca 100 Å) und eine dunkle Wand (50 Å) (Abb.22b).

DISKUSSION

Die den Körper in ganzer Länge durchziehenden dorsalen Riesenfasern im Bauchmark der Anneliden stellen seit dem letzten Jahrhundert ein klassisches Objekt neurobiologischer, anfangs vor allem histologischer Untersuchungen dar. Nach lange andauernden Kontroversen über die Natur der Riesenfasern steht seit der Jahrhundertwende fest, daß die Riesenfasern wirklich Nervenfasern sind. (Trotzdem hielt sich die Idee von der Stütz- und Ernährungsfunktion bis in die Mitte unseres Jahrhunderts, Nevmyvaka, 1950!). Sie sind im Zusammenhang mit raschen, reflektorischen Bewegungsabläufen von wichtiger Bedeutung für das Tier (Lit.: Günther und Walther, 1971).

1) Topographie der Riesenfasersepten

Die von Schneider (1902) bei Eisenia rosea zum ersten Mal erwähnten Septen der dorsalen Riesenfasern wurden lichtmikroskopisch von Stough (1926) und Günther (1971) ausführlich beschrieben. Die Lage der Septen und die Wellung der Flächen können bestätigt werden. Darüberhinaus lassen elektronenmikroskopische Bilder der vorliegenden Untersuchung erkennen, daß teilweise starke Einfaltungen der Septenflächen auftreten, welche die Oberfläche bis auf das Doppelte vergrößern.

Lange Zeit blieb die Stellung der Septen im Aufbau der Riesenfasern unbekannt. Erst im Zuge neuerer Untersuchungen zum Aufbau der dorsalen Riesenfasern von Regenwürmern zeigten Mulloney (1970) und Günther (1971) entgegen älteren Befunden (Ogawa, 1939), daß die Septen die Zellgrenzen zweier benachbarter Axone sind, die von nur jeweils einer Nervenzelle abstammen.

Stough (1926) hatte schon beobachtet, daß die Septen in manchen Ganglien ausnahmsweise nicht oder nur unvollkommen ausgebildet waren. Nach eigenen Ergebnissen und in Übereinstimmung mit Günther (1971) ist das Fehlen von Septen keinesfalls die Ausnahme, zumindest nicht

bei adulten Tieren, sondern eher die Regel. Vor allem entlang der medianen Riesenfaser fallen etwa die Hälfte aller möglichen Septen aus, bei den lateralen ungefähr jedes fünfte (Günther, 1971). Ob Septen fehlen oder ausgebildet werden, scheint zufällig und ohne Beziehung zueinander zu sein (Günther, 1971). Reste oder unvollständige Ausbildung von Septen konnte von Günther (1971) nicht, in eigenen Untersuchungen jedoch im elektronenmikroskopischen Bild in seltenen Fällen in Form von kurzen, frei im Cytoplasma liegenden Membranstücken beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit Günther (1971) und im Gegensatz zu den Befunden von Stough (1926) kann häufig licht- und elektronenmikroskopisch eine stärkere Plasmadichte auf der ventralen Seite des Septums beobachtet werden, die nach Wegfall der Septen und Axonfusion verschwindet. Ob es sich hierbei um eine besondere Strukturierung im Zusammenhang mit der Synapsenfunktion der Septen handelt oder lediglich um einen Plasmastau aufgrund des axoplasmatischen Flusses bzw. Transports, ist unklar.

Die Kenntnis zum Aufbau und zur Topographie der Neurofibrillen (Schultze, 1979; Smallwood und Holmes, 1927; Günther, 1971) in den dorsalen Riesenfaser der Regenwürmer, die lichtoptisch im Prinzip bestätigt wird, kann erstmalig um den elektronenoptischen Nachweis erweitert werden (s.S. 29, 58).

Die Beobachtungen an den dorsalen Riesenfaser von Lumbricus zum lamellären Aufbau ihrer Hüllen mit desmosomenartigen Haftstellen stimmen im wesentlichen mit den ausführlichen Untersuchungen an Eisenia überein (Hama, 1959). Damit liegen bei den Gliahüllen der bisher untersuchten Oligochaeten mit den Myelinscheiden der Vertebraten vergleichbare Strukturen vor, ohne jedoch deren hohen Strukturierungsgrad zu erreichen.

II) Feinbau des Septalkomplexes

Die erneute Feinstrukturanalyse der dorsalen Riesenfasersepten von Regenwürmern zeigt in Übereinstimmung mit Hama (1959),

Dewey und Barr (1964) und Coggeshall (1965), daß sie aus dem Axolemm zweier benachbarter Axonabschnitte bestehen und symmetrisch gebaut sind. Die ursprüngliche Annahme, daß die Septen aus Glia bestehen sollen (Schneider, 1902; Taylor, 1940; Issidorides, 1959), hat sich somit nicht bewahrheitet. Lediglich in Ausnahmefällen finden sich Gliaresten im Spalt, die auch von Günther (1971) erwähnt werden. Sie sind sicher ohne funktionelle Bedeutung und lassen sich dadurch erklären, daß der in die Riesenfaser neu eintretende Axonabschnitt Reste der eigenen Gliahülle, die normalerweise vor dem Eintritt vollständig verloren wird (Günther, 1971), mitgeschleppt hat.

Damit sind eng assoziierte, symmetrische Axonmembranen bei den als klassisches Beispiel für elektrische Synapsen geltenden Riesenfasersepten die generelle morphologische Basis der seit langem bekannten raschen und nicht einseitig gerichteten Erregungsübertragung (z.B. Eccles et al., 1933; u.a. vgl. S. 2). Als die eigentlichen Orte der Erregungsübertragung gelten distinkte, hochspezialisierte Membrankomplexe (Payton et al., 1969). Hier scheinen die für die dorsalen Riesenfasersepten von Lumbricus und Eisenia erstmalig beschriebenen spaltüberbrückenden Strukturen eine wichtige Rolle zu spielen. Ihre Bedeutung und die der anderen, bisher nicht bekannten Differenzierungen der Membranen, sowie der Vesikel, wird im folgenden in gesonderten Kapiteln diskutiert.

A) Orte der elektrischen Kopplung

1) "Gap junctions"

Alle bisher gemachten Untersuchungen sprechen dafür, daß die Antwort auf die Frage nach der Korrelation von Morphologie und Funktion der elektrischen Erregungsübertragung in einer speziellen Kopplungsstruktur zwischen zwei Zellen, der "gap junction", zu suchen ist (Revel und Karnovsky, 1967; Brightman und Reese,

1969; Payton, Bennett und Pappas, 1969; Pappas, Asada und Bennett, 1971). Diese Spezialform der Zellkopplung zeichnet sich durch eine sehr enge Assoziation benachbarter Membranen aus (20-40 Å). Sie weist im Tangentialschnitt eine charakteristische hexagonale Textur auf, mit einer Einheitszelle von im Mittel 100 Å, die Robertson (1963) im permanganatfixierten Goldfischgehirn an Synapsen zwischen "club endings" und Mauthnerzellen zum ersten Mal beschreibt.

Neben den konventionellen elektronenmikroskopischen Methoden lieferte vor allem die Gefrierätzung wertvolle Hinweise zur Strukturaufklärung der "gap junction" (Chalcroft und Bullivant, 1970; Googenough und Revel, 1970; Gilula und Satir, 1971; Friend und Gilula, 1972; Peracchia, 1973, II). Man hatte damit das Strukturäquivalent zu den elektro-physiologisch schon länger bekannten Daten gefunden (Lit.: Bennett, 1972), die zeigen, daß Regionen mit engen Membranabständen elektrophysionisch gekoppelt sind. Eine sowohl morphologisch als auch physiologisch zentrale Rolle spielen kleine, im Durchschnitt mit etwa 20 Å Durchmesser angegebene, cytoplasmatische Kanäle zwischen gekoppelten Zellen in der Mitte der Hexagone. Diese Kanäle gelten als verantwortlich für den Stoff- und Stromtransport (Lit.: Bennett, 1973).

Eines der best untersuchten Beispiele einer "gap junction" ist eine Invertebratensynapse, die nach Bau und Funktion mit der septalen Synapse der dorsalen Riesenfasern der Regenwürmer eng verwandt ist. Es handelt sich um die septalen Synapsen der lateralen Riesenfasern im Bauchmark der Krebse. Payton et al. (1969), Asada und Bennett, 1971 und Pappas et al. (1971) konnten für diese Synapse überzeugende Beweise für den Zusammenhang zwischen Struktur und elektrischer Kopplung finden: Die elektrische Kopplung erfolgt über die "gap junctions" der Septen. Der geringe elektrische Querwiderstand der gekoppelten Membranen kann durch äußere Einflüsse, wie z.B. Änderung des zellulären Ionenmilieus oder Verletzung der Septen, bis zur elektrischen Entkopplung erhöht werden. Als Folge lange andauernder Entkopplung rücken die vorher eng assoziierten Membranen auseinander, in den Zwischenraum wandert isolierendes Myelin ein.

Wie die vorliegenden Befunde zeigen, sind auch feinstrukturell Übereinstimmungen zwischen den Riesenfasersynapsen von Krebsen und Regenwürmern zu beobachten. Peracchia (1973,I,II) beschreibt an den "gap junctions" der septalen Riesenfasersynapse bei Krebsen membranständige "Globuli", die mit einem cytoplasmatischen und einem extrazellulären Anteil einander gegenüberliegen und in der Mitte des Spalts zusammentreffen. Im Querschnitt erscheinen periodisch helle und dunkle Streifen, im Tangentialschnitt ein hexagonales Muster (Abb.23C). Das Streifenmuster ist vergleichbar mit den bei beiden Regenwurmart gefundenen "septierten" Axonabschnitten. Die cytoplasmatischen Anteile der Globuli entsprechen nach Habitus und Elektronendichte den ebenfalls bei beiden Regenwurmart gefundenen Membranappositionen (Abb.5,13,23D). Übereinstimmung herrscht überdies in der hexagonalen Textur der im Tangentialschnitt quer getroffenen Globuli bzw. "Septen" mit Membranappositionen (Abb.6a,13,23D).

Die vor allem bei Lumbricus oftmals deutlich "septierten" Regionen sprechen zunächst nicht für eine Zuordnung dieser Kopplungsstruktur zum "gap junction"-Typ, da bei diesem "Septen" im Querschnitt selten zu beobachten sind und beim Krebs erst nach besonderer H_2O_2 -Kontrastierung sichtbar werden (Robertson,1963; Peracchia,1973,I). Außerdem sind "septate junctions" als ein eigenständiger Kopplungstyp mit niedrigem elektrischem Querwiderstand in verschiedenen Geweben beschrieben (Wood,1959; Locke,1965; Danilova et al.,1969; Gilula et al.,1970; Newell und Skelding,1973;u.a.). Morphologisch und physiologisch besonders gut untersucht sind die "septate junction" in Speicheldrüsen von Dipterenlarven (Loewenstein und Kanno, 1964; Wiener, Spiro und Loewenstein,1964; Loewenstein, Nakas und Sokolar,1967; Bullivant und Loewenstein,1968; Rose und Loewenstein, 1971; Rose,1971; Oliveira-Castro und Loewenstein,1971). Bullivant und Loewenstein (1968) zeigten an Chironomus, daß die "septierte" Spaltstruktur im Querschnitt die Projektion eines bienenwabenförmigen Kanalsystems darstellt, das senkrecht auf den Membranen steht. Die dunklen "Septen" (80 Å) repräsentieren die isolierenden Kanalwände, die hellen Zwischenräume (90 Å) das ionenpermeable Lumen (Abb.23A).

Prinzipiell liegt also den "septate junctions" wie auch den "gap junctions" ein leitendes Kanalsystem zugrunde. Während jedoch bei den "septate junctions" der extrazelluläre Raum, das Wabenlumen, als leitendes Element betrachtet wird, ist dieser beim "gap junction"-Modell (Payton et al., 1969; Peracchia, 1973, II) nicht an der Stromübertragung von Zelle zu Zelle beteiligt. Hier trennt der extrazelluläre Raum die massiven, elektrisch isolierenden Strukturen, die zentral den für die Leitung verantwortlichen, viel kleineren Kanal (20 Å) tragen, der zwei Zellen syncytial verbindet (Abb. 23B, 23C).

Der wichtige feinstrukturelle Unterschied zwischen den oben beschriebenen "septate junctions" und denen der Riesenfasersynapsen bei Lumbricus und Eisenia liegt darin, daß bei den letzteren die "Septen" deutlich mit cytoplasmatischen Membranappositionen versehen sind (Abb. 5), wie sie auch für die "gap junctions" der lateralen Riesenfasersynapsen der Krebse typisch sind (Peracchia, 1973, I; Abb. 23C). Die Folgerung daraus ist, daß, in Anlehnung an die Verhältnisse beim Krebs, die dunklen "Septen" zusammen mit den Membranappositionen auch bei den septalen Synapsen der dorsalen Riesenfasern der Regenwürmer im Sinne der von Axoplasma zu Axoplasma reichenden Globuli der "gap junction" interpretiert werden können und nichts mit "septate junctions" gemein haben, weshalb der Begriff in Zukunft in diesem Zusammenhang vermieden werden soll. Einen guten Beweis für diese Annahme liefert die Abb. 5d.

In der Abb. 23 sind in schematischer Form die Kopplungstypen "septate junction" und "gap junction" einander gegenübergestellt, weiterhin ist die Zuordnung der entsprechenden Strukturen der Riesenfasersepten der Regenwürmer zum "gap junction"-Typ gezeigt.

Die Zuordnung der "septierten" Regionen zum "gap junction"-Typ entspricht auch viel eher der physiologischen Bedeutung der Riesenfasersynapsen, zumal es nach neueren Arbeiten fraglich geworden ist, ob "septate junctions" bei der elektrischen Kopplung eine Rolle spielen. Elektrisch gekoppelte Zellen, wie in Speicheldrüsen von Chironomiden (Rose, 1971), in der Muschelkieme (Gilula et al., 1971) und im Leberblindsack von Daphnien (Hudspeth und Revel, 1971), weisen neben

"septate junctions" auch "gap junctions" auf. Wie Hama (1961), Robertson (1963), Payton et al. (1969), Asada und Bennett (1971) und Pappas et al. (1971) in elektrisch übertragenden Nervenzellen, Revel und Karnovsky (1967) und McNutt und Weinstein (1970) in Herzmuskelzellen und Benedetti und Emmelot (1968) und Revel und Karnovsky (1967) in Leberzellen zeigen konnten, sind "gap junctions" hier die einzigen für eine elektrische Kopplung in Frage kommenden Strukturen.

Eine Bedingung, die für fast alle bisher beschriebenen "gap junctions" gilt, ist bei beiden untersuchten Regenwurmarten jedoch nicht erfüllt: Die über weite Strecken ziemlich konstante Spaltbreite beträgt hier im Mittel das Doppelte bis Dreifache der sonst angegebenen Daten und erreicht auch im Minimalfall mit 40 Å nur gerade noch die obere Grenze des üblichen Wertes von 20-40 Å. Dies bestätigt die Befunde von Hama (1959) mit durchschnittlich 65 Å für Eisenia und Coggeshall (1965) mit mindestens 50 Å für Lumbricus. Im Gegensatz dazu finden Dewey und Barr (1964) tatsächlich über weite Strecken des permanganatfixierten medianen Septums von Lumbricus einen Spaltverschluß oder "Nexus". Aus anderen Beispielen ist aber bekannt, daß eine gewisse Affinität des Spaltmaterials zwischen zwei Zellen zu KMnO_4 vorhanden sein kann (Brightman und Reese, 1969). Dadurch entsteht eine elektronendichte Lamina von ungefähr der Spaltbreite, die einen Spaltverschluß vor- täuscht. Gegen einen "Nexus" im alten Sinne (Spaltverschluß, "tight junction") und für einen "Nexus" nach neuer Definition⁺ ("gap junction") sprechen außerdem Befunde von Barr et al. (1965, 1968), die zeigen, daß nach elektrischer Entkopplung der "Nexus" verschwindet (vgl. S. 33).

⁺ Der Spaltverschluß, "Nexus" (Dewey und Barr, 1962) oder "tight junction" (Farquhar und Palade, 1961) galt damals als die für die elektrophysiologische Kopplung verantwortliche Struktur, als "gap junctions" noch unbekannt waren. Wie man neuerdings weiß, gibt es Hinweise, daß "tight junctions" keine elektrische Kopplung vermitteln. Der Begriff "Nexus" hat inzwischen einen Bedeutungswandel erfahren und wird heute im Sinne von "gap junction" gebraucht (Lit.: Bennett, 1973). Zur Fixierungsabhängigkeit vgl. S. 40.

Die Frage ist nun, inwieweit die Abweichung von einer so wichtigen Bedingung, wie der Forderung nach einem möglichst engen, weil widerstandserniedrigenden Spalt, vom funktionellen Standpunkt aus noch haltbar ist. Die Annahme, daß sich die Spaltbreite notwendigerweise innerhalb der Größenordnung von 20-40 Å bewegen muß, trifft in der Tat nicht zu, wie Bennett und Auerbach (1969) aus elektrophysiologischen Daten rechnerisch ermittelten. Theoretisch sind sogar Spaltbreiten von einigen hundert Å tragbar. Ein Beispiel, bei dem die Spaltbreite 100-150 Å beträgt, ist in den Synapsen an Mauthnerzellen im Goldfischgehirn zu finden (Robertson, 1963). Allerdings wird die Kopplung mit zunehmender Spaltbreite schlechter. Dieser Nachteil kann bei den Riesenfaser-synapsen der Regenwürmer jedoch durch ein großes Areal mit "gap junctions", angezeigt durch das weit verbreitete Vorkommen von Membranappositionen, kompensiert werden. Betrachtet man die Verhältnisse beim Krebs, so erstreckt sich das Septum der lateralen Riesenfaser zwar über 100-150 µm Breite, beim Regenwurm sind es maximal 50 µm (laterale Riesenfaser) bzw. 100 µm (mediane Riesenfaser), die eigentliche synaptische Fläche ist jedoch erheblich geringer. Sechs bis zehn "synaptische Fenster", mit einer Ausdehnung von 1-3 µm pro Fenster, ergeben einen Durchmesser für das gesamte synaptische Areal von nur 6-30 µm. Der Rest des Septums ist im Gegensatz zum Regenwurm myelinisiert (Pappas et al., 1971).

Aus den vorliegenden Daten ergibt sich für die dorsalen Riesenfaser der Regenwürmer ein bisher nicht beschriebener Typ von "gap junction", der sich von den bekannten durch eine größere Maschenweite bis zu 350 Å und einen breiteren Septalspalt unterscheidet. Ein weiterer Ausnahmefall ist von den lateralen Riesenfasersepten der Krebse bekannt: Neben dem üblichen Muster von etwa 100 Å-Einheiten kommt ein größeres, mit doppelt so großen Einheitszellen vor (Peracchia, 1973, I), wobei die Spaltbreite aber 40 Å nicht übersteigt.

2) Nicht spezialisierte Membranen

Die elektrotonisch übertragenden Synapsen der dorsalen Riesenfaser

der Regenwürmer nehmen jedoch nicht nur hinsichtlich des abweichenden "gap junction"-Typs eine Sonderstellung ein. Als eine weitere mögliche elektrische Kopplungsstruktur kann darüberhinaus auch die feinstrukturell nicht spezialisierte Aneinanderlagerung der Septalmembranen betrachtet werden (Bennett und Auerbach, 1969), die man bei beiden Regenwurmartens häufig findet. Axo-axonale "en passant"-Kontakte der lateralen Riesenaxone von Lumbricus kurz vor ihrem Eintritt in die dorsalen Riesenfasern und Synapsen zwischen Kollateralen der medianen Riesenaxone zeigen im ersten Fall keine, im zweiten nur andeutungsweise eine charakteristische Spaltstruktur (Günther und Schürmann, 1973). In beiden Fällen ist jedoch die Spaltbreite 60-150 Å. Eine weitere, wahrscheinlich elektrottonische Synapse ist aus dem Rückenmark des Frosches bekannt, bei der die Spaltbreite sogar 170 Å beträgt (Grinell, 1966; Stensaas und Stensaas, 1971).

Damit sind bei den Septen der dorsalen Riesenfasern der Regenwürmer zwei Möglichkeiten feinstruktureller Organisation als Grundlage der elektrottonischen Erregungsübertragung verwirklicht, der "gap junction"-Typ und nicht spezialisierte Membranen.

B) Nichtsynaptische Membranspezialisierungen

Desmosomenartige Membrankontakte ("intermediate junctions") kommen gehäuft als mechanisch besonders stabile Strukturen an Geweben vor, die in hohem Maße mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, wie z.B. die Epidermis. Im Gegensatz zu "echten" Desmosomen haben sie kein medianes Stratum im Spalt und dehnen sich über weitere Strecken (bis zu 0,6 µm) aus (Farquhar und Palade, 1963, 1965).

Die "intermediate junctions" der dorsalen Riesenfasersepten können als mechanische Haftstruktur aufgefaßt werden, die den Zusammenhalt über weite Strecken gewährleisten. Im Gegensatz zu den lateralen Riesenfasersepten der Krebse, bei denen kleine synaptische Fenster von maximal 3 µm Durchmesser zwischen stützende Glia ein-

gespannt sind, überbrücken die Septalmembranen bei Regenwürmern bis zu 100 μm , bei starker Einfaltung der Septen sogar das Doppelte. Als einzige mögliche Struktur mit Stützfunktion begleiten sie die "intermediate junctions". Desmosomenähnliche nichtsynaptische Kontakte wurden verschiedentlich in Nervengeweben beobachtet (Peters et al., 1970).

C) Ausnahmebefunde

Die bei Lumbricus im Querschnitt in nur einem Fall gefundenen größeren Höcker werden als den "dense projections" vergleichbare Strukturen aufgefasst (Abb. 7c). "Dense projections" gelten an den meisten chemisch übertragenden Synapsen als charakteristische und funktionell wesentliche Struktur (Gray, 1963; Pfenniger, 1973).

Nimmt man an, daß an den Riesenfasersepten der Lumbriciden chemische Erregungsübertragung vorkommt (vgl. S. 4) und nicht nur eine formale Ähnlichkeit zwischen den genannten Strukturen besteht, so sprechen die Lage an vesikelfreien Stellen und vor allem die Seltenheit ihres Vorkommens hier gegen die ihnen zugeordnete Rolle. Aus anderen Beispielen ist jedoch bekannt, daß Abweichungen vom klassischen Bild der chemisch übertragenden Synapse vorkommen und "dense projections" fehlen können, wie manche Insektensynapsen zeigen (Lamparter et al., 1969; Boeckh et al. 1970). Dies gilt auch für gemischte Synapsen (Pappas und Waxman, 1972), so daß die gefundenen "dense projections" bei der nicht auszuschließenden chemischen Erregungsübertragung an den Riesenfasersepten der Lumbriciden sehr wahrscheinlich keine Rolle spielen. Welche ontogenetische und/oder phylogenetische Bedeutung "dense projections" bei der Entwicklung von Strukturen und Funktionsmechanismen der Erregungsübertragung an Riesenfasersepten der Regenwürmer spielen, falls sie überhaupt etwas damit zu tun haben, muß offen bleiben.

Bei Eisenia ist die Ähnlichkeit der Höcker mit "dense projections" weniger deutlich (Abb. 7d). Mäßig elektronendichtes Material im Spalt, das an den Höckern etwas verdichtet erscheint, erinnert

sogar an die Globuli der "gap junctions". Obwohl es sich hier um einen lokal eng begrenzten Ausnahmefall handelt, kann man diese Strukturen eventuell als ein zweites, größeres (und bei Lumbrici-
den seltenes ?) Globulimuster interpretieren (Peracchia, 1973, I).

D) Fixierungsabhängigkeit

Eine grundsätzliche Schwierigkeit, die bei jeder morphologisch-vergleichenden Betrachtung auftaucht, liegt in der Abhängigkeit des feinstrukturellen Erscheinungsbilds von den jeweiligen Fixierungsmethoden. Die Verwendung von Fixantien vergleichbarer Reaktivität erlaubt eine Standardisierung des morphologischen Erscheinungsbilds und liefert andererseits die Grundlage zur selektiven Darstellung bestimmter Strukturen durch spezielle histochemische Behandlung.

Die Kriterien zur Systematisierung der verschiedenen Zellorganelle sind Form, Größe und Elektronendichte. Bei jeder vergleichenden Betrachtung ist jedoch zu beachten, daß Größe und Elektronendichte einer Struktur bis zu einem gewissen Grad variabel sind, da prinzipiell vergleichbar reagierende Fixantien dennoch verschieden starke Affinitäten zu potentiellen Reaktionspartnern im Gewebe besitzen, was sich in Umfang und Elektronendichte der Niederschläge bemerkbar macht (vgl. S. 15). KMnO_4 - und Glutardialdehyd-Osmium-Fixierungen liefern beispielsweise generell die gleiche Positivimprägation. Im Detail unterscheiden sich die Fixantien jedoch dadurch, daß z.B. neben der mit beiden Methoden gefundenen starken Imprägnation von Membranen, die unmittelbare Nachbarschaft der Membranen nach KMnO_4 -Behandlung zum extrazellulären Raum hin ebenfalls relativ elektronendicht erscheint, was bei eng assoziierten Membranen anstelle eines Spalts einen Spaltverschluß vortäuscht, der funktionell eine völlig andere Bedeutung hat (vgl. S. 36).

Die Abhängigkeit des Gewebszustandes von der Fixierungstechnik hat im Hinblick auf Aussagen über die Funktion neben dem qualitativen auch noch einen quantitativen Aspekt: Von den "gap junctions"

elektrisch gekoppelter Membranen ist bekannt, daß während der Fixierung der Membranwiderstand zunimmt. Die physiologische Entkopplung geht mit der morphologisch nachweisbaren Abnahme von "gap junctions" einher (Bennett et al., 1967; Pappas et al., 1971; Berger et al., 1972; Lit.: Bennett, 1973). Damit ist die feinstrukturelle Veränderung der "gap junctions" unter verschiedenen Präparations- und Fixierungsbedingungen ein Maß für den physiologischen Zustand der elektrischen Kopplung bei den betreffenden Bedingungen. Während bei Lumbriciden innerhalb der angewendeten Normalfixierungsverfahren kein Unterschied in der Häufigkeit des Vorkommens von "gap junctions" feststellbar ist, wurden sie nach E-PTA-Imprägnation seltener, nach BIUL-Imprägnation bisher nicht beobachtet.

III) Cytochemie des Septalkomplexes

A) Imprägnation von spezialisierten Membrankontakten mit E-PTA und BIUL

Extrazelluläre und cytoplasmatische Membranauflagerungen oder "fuzz coats" (Akert et al., 1969) sind obligatorische Bestandteile von Membranen ("greater membrane"-Konzept, Revel und Ito, 1967; Lehninger, 1968). Im Gegensatz zu nicht spezialisierten Zellverbindungen sind die Membranbeläge bei chemischen Synapsen, desmosomenähnlichen Zellkopplungen und "gap junctions" modifiziert. Den "fuzz coats" wird eine besondere Funktion bei der intra- und interzellulären Interaktion zwischen Membranen beigemessen, so z.B. bei Vesikelmembran und Plasmalemma an chemischen Synapsen oder den Membranen von Desmosomen (Pfenninger, 1973).

Während Membranbeläge nach Normalfixierungen weitgehend hell bleiben, und die äußeren Lagen der trilaminaren Einheitsmembran durch OsO_4 elektronendicht dargestellt werden (Abb. 4), können mit den anionischen Schwermetallkomplexen PTA (Wolframatophosphorsäure) und BI (Wismutjodid) ohne Osmierung an den Membranen selektiv "fuzz coats" durch Reaktion mit basischen Gruppen dargestellt werden (Bloom und Aghajanian, 1966, 1968; Pfenninger, 1973).

1) "Intermediate junctions"

Die Riesenfasersynapsen von Lumbricus zeigen mit beiden Methoden die bekannte Negativimprägnation. Manche Stellen sind durch symmetrisch angeordnete, stark elektronendichte "fuzz coats", die auf der cytoplasmatischen Seite besonders mächtig ausgebildet sind, und einen durch die extrazellulären Membranbeläge reduzierten Spalt (30 Å) als "intermediate junctions" ausgezeichnet (Pfenninger, 1973; Bloom und Aghajanian, 1966). Mit beiden Imprägnationsarten bleibt ein Restspalt zwischen den "external fuzz coats" übrig, wie es für BIUL, nicht aber für E-PTA angegeben wird (Pfenninger, 1973; Abb. 12). Die Verteilung von "intermediate junctions" entspricht der von Normalfixierung.

Die mit BIUL häufig noch stärker ausgeprägten "fuzz coats", insbesondere der cytoplasmatische, sind auf eine zusätzliche Affinität von BIUL für Reaktionsorte zurückzuführen, die mit E-PTA nicht erfaßt werden (Pfenninger, 1973).

Die Abweichung der "internal fuzz coats" von der Bandstruktur bis zur Ausbildung "dense projection"-ähnlicher Höcker ist für "intermediate junctions" ungewöhnlich und tritt vor allem nach BIUL-Imprägnation auf. Es gibt jedoch keine systematischen Unterschiede zwischen den beiden Seiten des Septums, die auf eine morphologische Polarisation schließen ließen.

2) "Gap junctions"

Eine weitere Membranspezialisierung der Riesenfasersepten nach E-PTA-Blockimprägnation unterscheidet sich von "intermediate junctions" in den viel schwächer entwickelten "fuzz coats", vor allem den cytoplasmatischen. Sie ist vergleichbar mit BIUL-imprägnierten "gap junctions" aus dem Katzengehirn (Pfenninger, 1973). Den entscheidenden Hinweis für die "gap junction"-Natur dieser Membranspezialisierungen geben die auch bei E-PTA-Imprägnation auf der cytoplasmatischen Seite der "fuzz coats" beobachteten Membranappositionen. Sie sind zwar

kleiner als die von Normalfixierung her bekannten, in Habitus und Elektronendichte jenen aber sehr ähnlich (Abb.8d,9a). Sie sind nicht zu verwechseln mit Höckern, die innerhalb der Variabilität der Bandstruktur der Membranbeläge bei "intermediate junctions" vorkommen, da letztere stärker elektronendicht sind (Abb.9c).

Obgleich sich die schwach graue Färbung im Bereich der hier hellen Membranen meist nicht streng zwischen zwei gegenüberliegenden Membranappositionen lokalisieren läßt, ist die Richtigkeit der Annahme, daß es sich um in der Membran steckende Globulienteile handelt, nicht ausgeschlossen, zumal ähnliche Schwierigkeiten auch bei Normalfixierung auftreten. Trifft diese Möglichkeit zu, wäre die Existenz einer eigenständigen, die Membranen durchdringenden Verbindungsstruktur, wie sie von Peracchia (1973, I,II) erstmalig an den lateralen Riesenfasersepten des Krebses postuliert wurde, auch bei den Riesenfasersepten des Regenwurms mit zwei verschiedenen Fixierungen gezeigt (Abb.5,8d,9a).

Analog den Verhältnissen bei Eisenia kann man die aus Quer- und Parallelschnitten gewonnenen Strukturen, wie Globuli und Wabenmuster, einander größenmäßig zuordnen. Die insgesamt etwas kleineren Maße (Verringerung um ca 14%) können auf die Wirkungsweise von E-PTA zurückgeführt werden, da in ähnlichen Fällen Verringerungen der Maße bis zu 40% gegenüber Normalfixierung bekannt sind (Benedetti und Emmelot,1968; Peracchia,1973,II). Andererseits besteht die Möglichkeit, daß neben dem bei Eisenia aus Quer- und Flachschnitten, bei Lumbricus aus Querschnitten der Normalfixierung rekonstruierbaren Spaltnuster, noch ein engmaschigeres existiert, wie es von den Septen der lateralen Riesenfasern des Krebses bekannt ist (Peracchia,1973,I).

Trifft die Annahme zu, daß die mit zwei unterschiedlichen Fixierungen gefundenen globulären und hexagonalen Strukturen homolog sind, was Habitus und Elektronendichte vermuten lassen, sagt der Befund aus, daß die Globuli in ihrem molekularen Aufbau nicht

identisch mit den Septalmembranen und deren "fuzz coats" sind, da erstere durch E-PTA nicht, letztere stark elektronendicht imprägniert werden. Die Globuli bleiben dagegen im Quer- und Flachschnitt mäßig elektronendicht. Die Existenz einer biochemisch von der "greater membrane" verschiedenen Verbindungsstruktur zweier Zellen ist denkbar und widerspricht weder vom morphologischen noch vom physiologischen Standpunkt aus dem Konzept der "gap junction".

B) Imprägnation des Septalspalts mit Lanthan

Lanthannitrat wird neben anderen kationischen Schwermetallkomplexen (z.B. Ruthenium Rot) zur feinstrukturellen Demonstration extrazellulärer Räume in verschiedenen Geweben benützt (z.B. Revel und Karnovsky, 1967; Overton, 1968). Die Fähigkeit zur intensiv elektronendichten Imprägnation von Interzellularräumen ermöglicht vor allem die Auffindung und Charakterisierung von "gap junctions", bei denen die Existenz eines schmalen Spalts (ab $20 \text{ \AA}$) zwischen den gekoppelten Membranen mittels der Durchlässigkeit für Lanthan entdeckt wurde (Brightman und Reese, 1969). Man konnte nun diesen Kopp lungstyp als einen eigenständigen von dem der "tight junctions" trennen, an welchem der Tracerfluß gestoppt und so Spaltverschluß angezeigt wird. Wie sich herausgestellt hat, ist diese Unterscheidung nicht nur morphologisch sondern auch funktionell bedeutsam (Lit.: Bennett, 1973; s.S. 36).

Der Versuch, den Septalspalt zwischen den Membranen der Riesenfasern des Regenwurms mit Lanthan zu markieren, um so weitere Aufschlüsse über deren Kopplungsstrukturen zu erhalten, vor allem im Hinblick auf die von Dewey und Barr (1964) nach KMnO_4 -Imprägnation beschriebenen "tight junctions" (vgl. S. 36), verlief negativ. Der Grund hierfür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit darin, daß das Gliamaterial um die Riesenfasern und um das Bauchmark für kolloidales Lanthan nicht durchlässig sind. Vergleichbare Befunde liegen aus dem Gehirn von Maus und Fisch vor (Brightman und Reese, 1969). Auch scheint das Eindringungsvermögen des Tracers über die Stümpfe

der gekappten Seitennerven so gering zu sein, daß über diesen Weg kein Ergebnis erzielt werden konnte.

Die Ablösung der Gliahüllen um die Riesenfasern vor der Imprägnation, ohne den Axon und die Septen zu verletzen, wie es beim Krebs gelungen ist (Pappas et al., 1971), um das fragliche Gewebe unmittelbar mit dem Reagens in Berührung zu bringen, erweist sich beim Regenwurm als sehr schwierig. Es ist hier und in einem anderen Fall (Mulloney, 1970) nicht gelungen.

Wie parallele Versuche zur Prüfung der Qualität des Reagens mit einem Stück Darmwand von Lumbricus zeigen, bringt der unmittelbare Kontakt des zu imprägnierenden Gewebes mit Lanthan den gewünschten Erfolg (Abb. 12b). Ob bei der Ausbreitung des Tracers reine Diffusion oder auch andere Mechanismen zugrunde liegen, ist nicht geklärt, ebensowenig wie der Befund, daß Lanthan unspezifisch auch intrazellulär manche Zellen imprägniert und andere nicht. Es kommt sogar vor, daß innerhalb einer Zelle zwei nebeneinanderliegende Mitochondrien unterschiedlich, das eine positiv, das andere negativ, imprägniert werden (Bannister, 1970). Epithelzellen aus der Darmwand des Regenwurms zeigen ebenfalls in manchen Fällen eine Art von "negative staining" des Zellinhalts (Abb. 12b).

IV) Vesikel

Zwei Ereignisse der frühen Fünfzigerjahre brachten einen entscheidenden Einschnitt in der Erforschung der Struktur und Funktion von chemischen Synapsen: Die Beobachtung spontaner Miniaturpotentiale an der neuromuskulären Endplatte des Frosches (Fatt und Katz, 1952) und die Entdeckung kleiner, rundlicher Bläschen oder Vesikel von 300-500 Å Durchmesser an Synapsen im Bauchmark des Regenwurms (De Robertis und Bennett, 1954, 1955). Die Verbindung der beiden Ereignisse führte zur Formulierung einer allgemeinen "Vesikelhypothese" der chemischen Erregungsübertragung (Katz, 1969; Whittaker, 1970, 1971; Hubbard, 1971; Koelle, 1971), zumal man inzwischen in

fast allen Synapsentypen bei den verschiedensten Tierarten solche Vesikel gefunden hat. Durch ihr obligatorisches Auftreten in der präsynaptischen Region sind sie sogar zur charakteristischen Leitstruktur bei der feinstrukturellen Identifizierung chemischer Synapsen geworden.

Synaptische Vesikel spielen, nach allem, was man bisher darüber weiß, eine zentrale Rolle bei der chemischen Erregungsübertragung (Pappas und Purpura, 1972; Pfenninger, 1973). Umso unverständlicher ist dann die Tatsache, daß Vesikel, die sich feinstrukturell nicht von den obgenannten unterscheiden, an Synapsen vorkommen, die ausschließlich elektrotonisch übertragen (Lit.: Pappas und Purpura, 1972), und deren wesentlicher Unterschied zur chemischen Synapse gerade in der Erregungsübertragung ohne chemischen Transmitter besteht. Obwohl Vesikelvorkommen an elektrischen Synapsen keineswegs selten sind, ist die Information über sie außerordentlich spärlich. Meist geht sie, wenn überhaupt, über eine bloße Erwähnung nicht hinaus. Ihre Aufgabe ist unbekannt. Untersuchungen zur Transmitterspeicherung und -ausschüttung wurden fast ausschließlich an Vesikeln chemisch übertragender Synapsen durchgeführt. Über andere Funktionen, etwa trophische oder neurosekretorische, liegen keine Untersuchungen vor.

A) Vergleich mit Vesikeln an chemischen Synapsen

An den dorsalen Riesenfasersepten beider Regenwurmartenspezies ist der Bereich der durchschnittlichen Vesikelgrößen von Einzelpopulationen (467 Å, kleinster Wert, Eisenia, median, dorsale Einzelanhäufung und 690 Å, größter Wert, Lumbricus, median, ventrale Einzelanhäufung, Tab. 2, 3) und Summenmittelwerten (520 Å, Lumbricus, lateral, dorsal, kleinster Wert; 599 Å, Lumbricus, median, ventral, größter Wert) vergleichbar mit den Verhältnissen an chemischen Synapsen bei Vertebraten und Invertebraten. So findet man z.B. im ZNS von Vertebraten durchschnittliche Vesikelgrößen von 400-600 Å (Pappas und Purpura, 1972), bei Invertebraten, z.B. bei

Octopus, Vesikelgrößen von 425-691 Å in verschiedenen Synapsen (Froesch und Martin, 1972). Im Bauchmark von Lumbricus liegen die Verhältnisse ähnlich: Vesikel an efferenten und afferenten Kontakten messen 550-600 Å (Günther und Schürmann, 1973).

Die Besetzung von einzelnen Vesikelhaufen mit wenigen bis etwa der Hälfte "dense core vesicles" (500-900 Å) entspricht ebenfalls dem bekannten Bild der chemischen Synapse. Im ZNS von Vertebraten sind vorwiegend wenige (700-1000 Å), an manchen neuromuskulären Endplatten zahlreiche (800-900 Å) "dense core vesicles" vorhanden (Pappas und Purpura, 1972; Peters et al., 1970). Bei Invertebraten gilt wiederum Ähnliches: Im Bauchmark des Regenwurms findet man in verschiedenen chemischen Synapsen wenig bis häufig "dense core vesicles" (bis 900 Å, Günther und Schürmann, 1973). In "synaptic boutons" an der Riesenfaser erster Ordnung bei Octopus treten sowohl Vesikelpopulationen mit wenig neben solchen mit vorwiegend "dense core vesicles" auf (800 Å, Gervasio, Martin und Miralto, 1971).

B) Statistische Auswertung der Vesikeldurchmesser

Die statistische Auswertung der dorsal:ventral-Verteilung von Vesikeln bestimmter Größe an den Riesenfasersepten beider Regenwurmartarten zeigt keine einheitliche Tendenz. Bei Lumbricus sind die dorsalen Vesikel im Mittel signifikant kleiner, bei Eisenia größer, allerdings nicht signifikant, als die ventralen. Obwohl bei Lumbri-cus die statistische Absicherung in breiterem Umfang möglich ist als bei Eisenia, ist auffällig, daß sich die Größenbereiche der Vesikeldurchmesser beider Arten und unabhängig von ihrer Lage dorsal oder ventral der Septen, mit Ausnahme der Extremwerte, überlappen (Abb. 18), und über die Hälfte aller gemessenen Vesikeldurchmesser zwischen 500 Å und 600 Å liegen (Tabelle 5).

Im Hinblick auf den morphologisch und physiologisch symmetrischen Septalkomplex ist es fraglich, ob der Trend zur morphologischen Polarisierung der Septalregion bezüglich der Vesikelgrößen einerseits und die abweichenden Befunde zwischen Lumbricus und Eisenia anderer-

seits, im Zusammenhang mit der Synapsenfunktion auch physiologisch bedeutsam sind. Gegen eine solche Annahme sprechen außerdem der breite Überlappungsbereich der Vesikelgrößen auf beiden Seiten des Septums und die Tatsache, daß alle gefundenen Vesikeldurchmesser im Bereich der für Vesikel an chemischen Synapsen geltenden Größenverhältnisse liegen.

Vesikel unterschiedlicher Größenklassen sind aus dem ZNS von Vertebraten und Invertebraten bekannt und statistisch untersucht (Lit.: Froesch und Martin, 1972). Ein Beispiel für ebenfalls paarig gegenüberliegende Vesikelpopulationen mit signifikant unterschiedlichen Vesikeldurchmessern liegt aus synaptischen Endköpfchen am Riesenaxon erster Ordnung im palliovisceralen Lobus des Tintenfischs vor. Die Synapse wird aus morphologischen Gründen als chemisch übertragend eingestuft (Froesch und Martin, 1972). In diesem wie in allen übrigen Fällen wird den Vesikeln eine Rolle im chemischen Übertragungsmodus beigemessen. Es gibt bis jetzt keinen Anhaltspunkt dafür, ob klare (synaptische) Vesikel bestimmter Größenklassen andere Aufgaben als die ihnen bisher zugesprochenen haben.

C) ZIO-Imprägnation

Die Vesikelimprägnation dient der Unterscheidung verschiedener Vesikeltypen. Systematische Untersuchungen haben ergeben, daß synaptische Bläschen nach Größe, Form und chemischer Affinität zu ZIO (Zinkjodid-Osmium) in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Allerdings ist die Korrelation zwischen vesikulärer Morphologie und Biochemie immer noch unvollständig, und bis heute fehlen ausreichend spezifische cytochemische Methoden zum direkten elektronenmikroskopischen Nachweis von Transmittersubstanzen (Akert, 1971).

Die negative Reaktion des Inhalts der klaren Vesikel an den dorsalen Riesenfasersynapsen von Lumbricus zählt zu den Ausnahmen und ist bisher nur in wenigen Beispielen beschrieben. Vesikel an axo-axonalen Kontakten der Riesenfasern erster und zweiter, sowie zweiter und dritter Ordnung bei Loligo zeigen keine Reaktion nach ZIO-Behandlung

(Martin et al., 1969; Froesch und Martin, 1972), obwohl größenordnungsmäßig vergleichbare Vesikel im Gehirn von Octopus (300-600 Å) ZIO-positiv sind (Martin et al., 1969; Barlow und Martin, 1972). Ein Beispiel für Vertebraten ist aus dem olfaktorischen Bulbus der Ratte bekannt (Dennison, 1971).

Es ist auffallend, daß speziell an axo-axonalen Riesenfasersynapsen bis jetzt keine ZIO-Vesikelimprägnation gelungen ist. Für die Riesenfasersynapse zwischen Axonen zweiter und dritter Ordnung bei Loligo gibt es Hinweise, daß sie nicht cholinerg sind (Bryant, 1958).

Bei der Beurteilung der ZIO-Versuche ist zu beachten, daß in dünnen Präparaten oder Oberflächenbereichen bis ca 50 µm Tiefe aus unbekannten Gründen keine Imprägnation gelingt (Martin et al., 1969). Bei Lumbricus bewegen sich die Maße für die beiden Gliahüllen um die Riesenfaser und das Bauchmark etwa in der kritischen Distanz, so daß dies ein möglicher Grund für die negative Reaktion sein könnte. Das Fehlen der Reaktion nach 10 Stunden, läßt eine Verlängerung der Inkubationsdauer als nicht aussichtsreich erscheinen; vielmehr ist die ZIO-Negativität der Vesikel möglicherweise auch auf Diffusionsschwierigkeiten des Reagens in Gegenwart von OsO_4 zurückzuführen (Pfenninger, 1975, pers. Mitteilung).

Die wenigen "dense core vesicles" in der Größenordnung von 500-900 Å unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber ZIO nicht von denen an chemisch übertragenden Synapsen. Sie sind durchweg ZIO-negativ. Über ihre Rolle im synaptischen Geschehen ist derzeit nichts Genaues bekannt. Eventuell sind sie an monoaminergen Synapsen, durch ihre Fähigkeit Monoamine anzuhäufen, zusätzliche Transmitterspeicher oder sonstwie am Transmitterstoffwechsel beteiligt (Pfenninger, 1973).

Die Feinstrukturanalyse der agranulären Vesikel an den Riesenfasersepten von Lumbricus und Eisenia nach Größe und Habitus, sowie der Anteil an granulären Vesikeln, entspricht den Verhältnissen an einer chemischen Synapse. Die ZIO-Negativität der agranulären Vesikel ist zwar selten, sie widerspricht aber nicht einer chemischen Erregungs-

Übertragung (Froesch und Martin, 1972). Damit ist die Möglichkeit, daß die klaren Vesikel an den Riesenfasersepten der Regenwürmer Orte chemischer Erregungsübertragung charakterisieren, nicht auszuschließen, aber auch nicht bewiesen.

D) Topographie und funktionelle Konsequenzen

Die Vesikelvorkommen, insbesondere an der medianen Riesenfaser-synapse, sind verhältnismäßig umfangreich und häufig. Sie weichen damit von anderen elektrischen Synapsen, wie z.B. der septalen Synapse der lateralen Riesenfasern der Krebse (Pappas et al., 1971; Peracchia, 1973, I, II), axosomatischen und axodendritischen "electrotonic junctions" von Gymnotiden (Bennett et al., 1967) oder der Synapse zwischen dem medianen Riesenaxon und dem Rieseninterneuron beim Regenwurm (Günther und Schürmann, 1973) ab. Weder nach Lage und Anzahl der Haufen, noch nach deren Bestzungszahl mit Vesikeln, ist irgendeine Polarisierung zwischen der dorsalen und der ventralen Seite erkennbar (Abb. 19A). Betrachtet man die Vesikelvorkommen in situ, so ist bemerkenswert, daß sie häufig, wenn auch nicht immer, mit einer Erweiterung des Septalspalts von 75 Å auf bis zu 180 Å, sowie einer Verdickung der Axonmembranen einhergehen. In der Tat kennt man gemischte Synapsen mit Vesikeln an desmosomenartigen Regionen, bei denen die Membranen gewöhnlich 200 Å weit auseinander liegen. Sie weichen im Erscheinungsbild von der typischen chemischen Synapse eben darin ab, daß keine erkennbare morphologische Polarisierung in präsynaptische "dense projections" und postsynaptisches Band vorliegt (Pappas und Waxman, 1972; vgl. S. 39).

Das häufige Vorkommen der Vesikel auf beiden Seiten des Riesenfaser-septums spricht zunächst dagegen, die Stellen mit Vesikelhaufen, Spalterweiterung und Membranverdickung aufgrund ihrer Struktur als chemisch übertragend einzustufen und damit den Riesenfasersepten die Eigenschaft einer gemischten Synapse zuzusprechen. Jedoch ist die ausschließlich präsynaptische Lage und die dazu in Beziehung gesetzte physiologische Polarisierung eine Regel mit Ausnahmen. So sind

beidseitige Vesikelanhäufungen z.B. nachgewiesen worden, neben den Kontakten am Riesenfaseraxon erster Ordnung von Loligo (Gervasio et al., 1971; vgl. S. 47), im Marginalganglion einer Meduse (Horridge und MacKay, 1962; Iha und Mackie, 1967) und im Nervennetz von Hydra (Westfall et al., 1971). Es bleibt fraglich, ob in diesen und ähnlichen Fällen die Impulsübertragung in beiden Richtungen und ausschließlich chemisch erfolgt.

Nimmt man für Lumbricus und Eisenia aufgrund der neuen feinstrukturellen Befunde eine gemischte Synapse an, dann bietet sich auf der Basis der "Vesikelhypothese" (vgl. S. 45) als Erklärung für das beidseitige Vorkommen der Vesikel die Tatsache an, daß die Septen die Fähigkeit zur beidseitigen Impulsübertragung haben, und diese im Bereich der jeweiligen afferenten Verbindungen auch unter natürlichen Umständen realisiert ist (Bullock, 1945; Rushton, 1945). Die Annahme einer gemischten Synapse wird durch neue elektrophysiologische Messungen gestützt. Christoffer-Sen und Miller (1973) berichten von zwei Typen exzitatorischer Aktivität an der medianen Riesenfaser von Lumbricus: Beim ersten Typ lassen sich durch einen kurzen Reiz zyklische Depolarisationen mit Aktionspotential auslösen, die ohne Bahnung ("potentiation") oder Ermüdung transseptal gemessen werden können. Dies spricht für eine elektrische Übertragung. Der zweite Typ zeichnet sich durch kleine Depolarisationen aus, die nur in der repolarisierenden Phase des Aktionspotentials auftreten. Sie ermüden bei wiederholter Reizung nach ca 100 msec und sind nicht in der Lage, die Riesenfaser neu zu erregen, was für eine chemische Übertragung spricht.

In diesem Zusammenhang ist das im Flachschnitt an einer medianen Riesenfasersynapse in wenigen Beispielen gefundene Gitterwerk mit hellen Zellen (ca 500 Å) und dunklen Wänden (ca 100 Å) von Interesse (Abb. 6c). Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die Aufsicht auf die Membranoberfläche. Auffällig ist, daß sich dieses Muster in einer Region befindet, wo auch Vesikel einigermaßen gehäuft vorkommen. Bringt man die beiden Beobachtungen mit-

einander in Verbindung, so besteht die Möglichkeit, das Netzwerk, analog dem präsynaptischen Bläschengitter an chemisch übertragenden Synapsen, als eine Verteilerstruktur für Vesikel an der Septalmembran zu interpretieren, wobei das helle Lumen als Vesikelbehälter diene, was größtmäßig möglich ist. Trotz des regelmäßigeren Strukturierungsgrads an der Vertebratensynapse liegen in beiden Fällen die Zentren der Vesikelbehälter etwa 500 Å auseinander (z.B. Akert, 1971). Ein wesentlicher Unterschied liegt allerdings darin, daß das klassische präsynaptische Bläschengitter als beherrschende Struktur "dense projections" aufweist, die hier fehlen (vgl. Pfenninger, 1973). Die "dense projection"-ähnlichen Gebilde aus Querschnitten der Septen (Abb. 7c, 7d) sind hier nicht nachweisbar.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit ist, das Netzwerk als bereits an die Membran angeheftete Vesikel zu betrachten, und die hier im Vergleich zum bekannten runden Querschnitt etwas deformierte Gestalt der Vesikel als morphologischen Ausdruck eines besonderen physiologischen Zustands anzusehen. Diese Betrachtungsweise wird durch die Beobachtung gestützt, daß im Lumen des Gitters gelegentlich ein dunkler Kern zu sehen ist, der auf einen "dense core" Vesikel hindeutet.

Verwirft man die Annahme einer chemischen Übertragung, erhebt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Vesikel an ausschließlich elektrotonischen Synapsen. Da immer noch Bedenken gegen eine allgemeine Gültigkeit der "Vesikelhypothese" der chemischen Übertragung bestehen (Robertson, 1970; Florey, 1971; Nachmansohn, 1971), könnte man die Existenz der Vesikel an einer bisher als rein elektrisch betrachteten Synapse als Indiz gegen die Rolle, die ihnen von der "Vesikelhypothese" zugeschrieben wird, heranziehen. Für die "giant fiber-to-motor-Synapse der Krebse besteht eine entsprechende Verständnislücke. Auch hier ist der elektrophysiologische Nachweis einer elektrischen Übertragung (Furshpan und Potter, 1959) nicht mit allen strukturellen Befunden vereinbar: Elektrische Übertragung

ist gekoppelt mit physiologischer Polarisierung, geringer Spaltbreite und synaptischen Vesikeln. Die von Hama (1961) beschriebene beidseitige Vesikelpräsenz ist nach Stirling (1972) allerdings fraglich.

In jüngster Zeit wurde an einem bisher einzigen Beispiel die mögliche Funktion der Vesikel an einer ausschließlich elektrotonischen Synapse genauer untersucht. Die septalen Synapsen der lateralen Riesenzellfasern der Krebse zeigen weder physiologisch noch feinstrukturell, außer der Anwesenheit beidseitig gelegener Vesikel, irgendwelche Merkmale für eine gemischte Synapse (Asada und Bennett, 1971; Pappas et al., 1971). Anhand des Feinbaus dieser Vesikel entwickelte Peracchia (1973, II) mittels Gefrierätztechnik folgendes Funktionsmodell: Durch den Kontakt globulärer Strukturen mit zentralem Kanal in den Axon- und Vesikelmembranen (vgl. S. 34; Abb. 23C) soll ein Stoffaustausch zwischen Kompartimenten diesseits und jenseits des Septums erfolgen. Über die Art der Stoffe ist nichts bekannt. Die Vesikel an den Riesenzellsepta der Lumbriciden sind vermutlich anderer Natur. Einmal haben sie die Tendenz größere Anhäufungen zu bilden, die für den Krebs beschriebene einreihige Lage an den Septen kommt sehr selten vor, zum andern findet man mit den angewendeten Verfahren keine Globuli in den Vesikelmembranen.

E) Vergleich mit neurosekretorischen Vesikeln

Auf der Suche nach der funktionellen Bedeutung vesikulärer Strukturen darf die Möglichkeit einer Beteiligung bei neurosekretorischen Vorgängen nicht außer Acht gelassen werden. Die Fähigkeit von Nervenzellen zur Neurosekretion ist seit langem bekannt und für Oligochaeten von Scharer und Scharer (1937) erstmalig beschrieben.

Die Abgrenzung des chemisch-synaptischen von dem des neurohormonellen Systems ist nicht ohne weiteres möglich, da sich beide Systeme membranbegrenzter Vesikel von unterschiedlicher Form, Größe, Vergesellschaftung und mit verschiedenen Inhaltsstoffen bedienen (Scharer, 1969). Auch kennt man neurosekretorische Kontakte, die nach Spaltbreite,

Membranverdickung und Vesikelvorkommen synapsenartig ausgebildet sind (Vollrath,1967).

Eine Möglichkeit, synaptische und neurohormonelle Vesikel nach morphologischen Kriterien zu trennen, ist durch die Größe von mehr als 1000 Å (mit Ausnahmen, Myhrberg,1972) und das verhältnismäßig seltenere Auftreten von Vesikeln stark elektronendichten Inhalts an Synapsen gegeben (Scharrer,1969). Demnach sind die Vesikel der dorsalen Riesenfasersepton bei Regenwürmern eher dem synaptischen als dem neurohormonellen Typ zuzuordnen.

Faßt man die Befunde zusammen, so ergibt sich für die Vesikel an den septalen Synapsen der dorsalen Riesenfasern bei Regenwürmern folgendes Bild: Nach Größe, Inhalt, Packung und Lage dicht an den oft synaptisch verdickten Membranen mit Spalterweiterung, sind sie eher synaptisch als neurohormonell. Das relativ häufige Auftreten solcher Vesikel, zumindest an den medianen Riesenfasersepten, ergibt den Status einer gemischten Synapse. Dies stimmt mit elektrophysiologischen Befunden überein (Christoffersen und Miller,1973): An der medianen Riesenfaser von Lumbricus treten zwei Typen exzitatorischer Aktivität auf, von denen einer für elektrische, der andere für chemische Erregungsübertragung spricht (vgl.S.51). Histochemisch gehören die Vesikel zum seltenen Typ der klaren ZIO-negativen Vesikel.

Über eine Beteiligung von Vesikeln elektrischer Synapsen an trophischen Vorgängen ist nichts bekannt.

V) Transseptale Permeabilität

Der aus der umfangreichen Gruppe der Procion-Farbstoffe (Zyanurinsäure-Chloridderivate) stammende Textilfarbstoff Procion Yellow wurde erstmals von Stretton und Kravitz (1968) zur Untersuchung neuronaler Verbindungen in Abdominalganglien des Hummers verwendet. Seine Brauchbarkeit für biologische Markierungsversuche basiert auf folgenden Eigenschaften: Der Farbstoff ist wasserlöslich, ein guter Elektrolyt, nicht toxisch und selbst in geringen Mengen noch nach-

weisbar. Weiterhin kann er mit den Kohlenwasserstoffen und Proteinen der Zellen kovalente Bindungen eingehen, was seine färberischen Eigenschaften bedingt.

Der Befund, daß intrazellulär diffundierendes Procion Yellow eine Zelle bis in die feinsten Verästelungen erfüllt, im Normalfall jedoch nie die intakte Zellmembran nach außen passiert, eröffnete eine weitere Möglichkeit, die besonderen Verhältnisse in elektrisch gekoppelten Membranen zu testen.

Wie an den lateralen Riesenfasern des Krebses (Payton et al., 1969) und an Speicheldrüsen von Chironomidenlarven (Rose, 1971) gezeigt werden konnte, lassen intakte Membranen im elektrisch gekoppelten Zustand relativ große Moleküle wie den verwendeten Farbstoff (MG für Procion Yellow: ca 550) passieren. In diesen Fällen wurde der Farbstoff mit Hilfe von intrazellulär eingeführten Glaskapillaren elektrophoretisch injiziert. Der Versuch, die dorsalen Riesenfasern des Regenwurms mittels Druckinjektion anzufärben, erbrachte zur Frage der Durchlässigkeit elektrisch gekoppelter Membranen widersprüchliche Ergebnisse (Mulloney, 1970). Während die Querverbindung der lateralen Riesenfasern, die über eine elektrische Synapse erfolgt (Wilson, 1961), für Procion Yellow durchlässig war, konnte an den Riesenfasersepten im intakten Zustand kein Farbstoffdurchtritt in den postseptalen Bereich beobachtet werden. Diese Befunde widersprechen den hier gefundenen Ergebnissen, bei denen die medianen und lateralen Riesenfasersepten für iontophoretisch appliziertes Procion Yellow durchlässig sind. Da der Druck bei der Farbstoffinjektion in den Versuchen von Mulloney (1970) jedoch so beträchtlich war⁺, daß es gelegentlich zum Zerreißen der Septen kam, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß der labile Zustand der elektrischen Kopplung (vgl. S. 40) durch die unphysiologische mechanische Belastung beeinträchtigt wird, auch wenn das Septum äußerlich noch nicht beschädigt ist. Die elektrische Synapse in der

⁺ Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag nicht in der Untersuchung der transseptalen Permeabilität.

Querverbindung der beiden lateralen Riesenfasern liegt dagegen aus anatomischen und topographischen Gründen (viel dünnere Fasern, räumliche Entfernung von den Riesenfasersepten) zur Druckwelle praktisch im Nebenschluß und wird von der Farbe sehr wahrscheinlich vorwiegend auf dem Diffusionsweg erreicht.

Die bei der iontophoretischen Applikation des Farbstoffs verwendete Stromstärke von 12 mA erscheint im Vergleich zu den in anderen Untersuchungen angegebenen Stromstärken, die vorwiegend im nA-Bereich liegen, extrem hoch. Während sich jedoch in jenen Versuchen bei intrazellulärer Farbstoffapplikation die Stromstärke auf eine Zelle mit wenigen μm beschränkt (z.B. Stretton und Kravitz, 1968; u.a.), ist hier das ganze Bauchmark betroffen. Die Stromdichte an den Septen ist daher erheblich geringer. Für die folgende Überschlagsrechnung zur Abschätzung der Stromdichte an den Riesenfasersepten sind gliöse Anteile des Bauchmarks, soweit möglich, weggelassen, da Glia im Verhältnis zum Nervengewebe ein viel schlechterer Leiter ist. Deshalb gehen die Flächen der äußeren Gliahülle und die der Einzelhüllen der drei Riesenfasern nicht in die Berechnung ein.

Zur Berechnung der Stromdichte auf den Bauchmarksquerschnitt wurde seine Form als Ellipse mit einer langen Achse von 475 μm und einer kurzen von 255 μm Länge betrachtet. Die Fläche errechnet sich zu rund 132 000 μm^2 . Die Stromdichte pro 1 μm^2 beträgt bei einer Ausgangsstromstärke von 12 mA 91 nA. Für die drei als Kreise angenommenen Riesenfaserquerschnitte, mit 100 μm Durchmesser für die mediane und je 50 μm für die lateralen, ergibt sich eine Gesamtfläche von 11 776 μm^2 . Die Stromdichte auf dieser Fläche ist 1 070 μA . Die Septen werden als schräg gelegene Ellipsen aufgefaßt. Für die mittlere gilt eine lange Achse von 200 μm (Längenausdehnung des Septums) und eine kurze von 100 μm (Durchmesser der Riesenfaser). Bei den lateralen Septen werden 100 μm für die lange und 50 μm für die kurze Achse angenommen. Die Gesamtfläche für die Riesenfasersepten beträgt 23 550 μm^2 . Auf diese Fläche verteilt sich die Stromdichte der Riesenfaserquerschnitte, also 1 070 μA . Bezogen auf 1 μm^2

der Septenfläche ergibt sich eine Stromdichte von 45 nA. Das ist die Hälfte der Stromdichte in den Riesenfaserquerschnitten. Nun ist aber noch zu beachten, daß die Flächen der Septen infolge von Einfaltungen vergrößert sind (Abb.3a). Nimmt man als durchschnittlichen Wert eine doppelt so große Fläche an, so reduziert sich die Stromdichte noch einmal um die Hälfte auf 23 nA pro $1 \mu\text{m}^2$.

Obwohl bei dieser Überschlagsrechnung die unterschiedliche Leitfähigkeit innerhalb des Bauchmarks nicht berücksichtigt ist, die in den Riesenfasern sicher größer ist als im Neuropil, gibt sie dennoch einen Anhaltspunkt für vergleichende Betrachtungen mit den Verhältnissen an den lateralen Riesenfasersepten des Krebses. Hier schwankt die synaptische Fläche bei einem Durchmesser von 6-30 μm (vgl.S.37) zwischen 28 μm^2 und 707 μm^2 . Die Farbstoffinjektion erfolgte mit einer Stromdichte von 0,5 μA (Payton et al., 1969). Daraus folgt eine Stromdichte von 0,7 nA bis 18 nA pro $1 \mu\text{m}^2$ Synapsenfläche. Demnach ist die Stromdichte an den Riesenfasersepten des Regenwurms 1,3 bis 33 mal höher. Wie die Abb.20,21a, 21b zeigen, führte dieser Unterschied nicht zur elektrischen Entkopplung.

Der Beweis für die Durchlässigkeit der Riesenfasersepten des Regenwurms ist die im Vergleich zum Kontrollpräparat vorhandene, wenn auch schwächere Fluoreszenz im postseptalen Bereich. Wie beim Krebs gezeigt wurde, ist der Grad des Intensitätsunterschieds abhängig von der Inkubationsdauer nach der Injektion. Gibt man dem Farbstoff eine genügend lange Diffusionszeit, so nimmt die Fluoreszenz im nicht injizierten Axonabschnitt laufend zu und erreicht fast den Wert des injizierten Axons (Payton et al., 1969; Lit.: Bennett, 1973).

Die am medianen Riesenfaserseptum zu beobachtende, sehr intensive Fluoreszenz auf der ventralen Seite ist letztlich nicht auf einen Farbstoffstau vor dem Septum zurückzuführen. Sie entspricht vielmehr der besonders an medianen Riesenfasersepten häufig zu beobachtenden stärkeren Plasmadichte im ventralen Bereich. Dieses Färbverhalten entspricht dem von Toluidinblau nach Schnittfärbung (Abb.2c).

Ein Effekt der im Vergleich zur Krebs synapse erhöhten Stromdichte könnte die gelegentlich auftretende Koagulation des Plasmas der Riesenfasern und die unregelmäßige Farbstoffverteilung sein, obwohl man ähnliche Bilder auch gelegentlich nach Normalfixierung allein erhalten kann.

Im Rahmen der Fragestellung nach Bau und Funktion der Riesenfaser-septen liefert die Permeabilität der Septalmembranen für Procion Yellow einen weiteren Beweis für die elektrische Kopplung und die Existenz von "gap junctions" als Orte des Stoff- und Stromtransports.

IV) Mikrotubuli und Neurofilamente

Die Neurofibrillen der dorsalen Riesenfasern des Regenwurms und ihre Beziehungen zu den Septen wurden von Smallwood und Holmes (1927), Ogawa (1939) und Günther (1971) lichtmikroskopisch ausführlich beschrieben: Sie erscheinen im Längsschnitt in den interseptalen Strecken als dunkler, diffuser Streifen im Zentrum des Axoplasmas. Dies stimmt überein mit eigenen Beobachtungen an Semidünnschnitten. Anders als bei Smallwood und Holmes (1927) und Günther (1971) treten in Septennähe sowohl in Semidünnschnitten als auch in Dünnschnitten keine besonders starken Spiralisierungen und Verknäuelungen auf, die wesentlich über das an anderen Fibrillenabschnitten gefundene Maß hinausgehen. Die Fibrillen diesseits und jenseits des Septums erinnern an den von Günther (1971) beschriebenen posterioren Fibrillenstrang, der, anders als von Smallwood und Holmes (1927) angegeben, wenig spiralisiert und ohne Verknäuelung ist (Abb.3a,22). In Übereinstimmung mit früheren lichtmikroskopischen Befunden fächert das Fibrillenbündel vor dem Septum auf und verliert sich, ohne Kontakt mit dem Septum aufzunehmen. Jedoch ist die Auffächerung, auch im elektronenmikroskopischen Bild, wiederum weniger weitgehend als bei den lichtmikroskopischen Präparaten der oben zitierten Autoren.

Die Unterschiede können zumindest teilweise auf die verschiedenen Fixierungsverfahren zurückzuführen sein, wobei das zur Feinstruktur-analyse das schonendste ist und die beste Gewebserhaltung gewährleistet.

Es ist damit der bessere Ausgangspunkt zur Interpretation der auftretenden Strukturen. Starke Verknäuelungen und Spiralisierungen können demnach durchaus Fixierungsartefakte sein.

Versuche, die Neurofibrillen in den dorsalen Riesenaxonen der Regenwürmer elektronenoptisch darzustellen, blieben lange Zeit erfolglos. Erst im Zuge der eigenen Untersuchungen gelang es, Neurofilamente (axoplasmatische Filamente) und Mikrotubuli (Neurotubuli, Canaliculi) als Bauelemente der Fibrillenstränge feinstrukturell nachzuweisen. Die generelle Frage, ob die dickeren lichtmikroskopisch sichtbaren Neurofibrillen mit den Mikrotubuli und Neurofilamenten des elektronenmikroskopischen Bildes identisch sind, läßt sich nach Befunden von Gray und Guillery (1966) positiv beantworten. Nach Bullock und Horridge (1965) können die Neurofibrillen als verklumpte Neurofilamente und Mikrotubuli aufgefaßt werden. Bei Lumbricus spricht für diese Annahme, daß Lage und Anordnung von Fibrillen einerseits und Neurofilamenten und Mikrotubuli andererseits topographisch übereinstimmen. Vor allem kann auch elektronenoptisch kein direkter Kontakt zum Septum nachgewiesen werden. Aus anderen Beispielen ist ebenfalls bekannt, daß Neurofilamente und Mikrotubuli kurz vor der Synapse endigen (Peters et al., 1970).

Der tubuläre Feinbau der Neurofilamente und Mikrotubuli, letztere gelegentlich mit einem dunklen Kern im Zentrum, entspricht den Beobachtungen in Neuronen und anderen Zellen (Porter, 1966). Die Neurofilamente bleiben mit $50 \text{ \AA}$ etwas kleiner als üblicherweise (bis $100 \text{ \AA}$), die Mikrotubuli entsprechen mit $250 \text{ \AA}$ den Daten bei Lumbricus (Günther und Schürmann, 1973) und anderen (Peters et al., 1970), einzelne bleiben mit $160 \text{ \AA}$ etwas kleiner (Abb. 22).

Die Funktion dieser Zellorganelle ist unklar. Als eine mögliche Aufgabe, die auch hier in Betracht käme, wird der axoplasmatische Stofftransport genannt (Porter, 1966; Davison, 1970). Weiterhin wird eine Beteiligung bei der Orientierung der synaptischen Vesikel an der präsynaptischen Membran diskutiert (Capaldi, 1974). Ihre topographische Beziehung zu den Septen könnte aber auch auf einen bisher nicht verstandenen Zusammenhang mit deren Synapsenfunktion hinweisen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die erneute elektronenmikroskopische Untersuchung der dorsalen Riesenfasern der Lumbriciden Lumbricus terrestris (L.t.) und Eisenia foetida (E.f.) zeigt, daß es sich bei den segmentalen Synapsen (Septen) um Strukturen bisher unbekannter Komplexität handelt:

- 1) Die Septen von L.t. und E.f. sind morphologisch nicht polarisiert. Sie bestehen aus dem Axolemm benachbarter Axonabschnitte. Nur in seltenen Fällen finden sich Gliareste im Spalt.
- 2) Der Septalspalt beträgt bei L.t. im Mittel $75 \text{ \AA}$, bei E.f. $65 \text{ \AA}$.
- 3) An den Septalmembranen fallen bei L.t. und E.f. neben nicht spezialisierten Membranabschnitten folgende Differenzierungen auf:
 - a) "Intermediate junctions", als desmosomenartige mechanische Haftstrukturen;
 - b) "gap junctions", mit Wabenmuster im Flachschnitt und Globuli (spaltüberbrückende "Septen" mit Membranappositionen auf der cytoplasmatischen Seite) im Querschnitt, als Orte der elektrophysologischen Kopplung;
 - c) "dense projection"-ähnliche Höcker, deren Aufgabe an den Riesenfasersepten nicht geklärt ist.
- 4) Auf beiden Seiten der Septen von L.t. und E.f. kommen Vesikel vor, die von einer Einheitsmembran umschlossen sind und nach Größe, ($\varnothing$ ca $500-600 \text{ \AA}$), Lage, Haufenbildung und elektronenoptischem Habitus den Vesikeln chemisch übertragender Synapsen gleichen.
- 5) Spezielle histochemische Methoden bestätigen "intermediate junctions" (E-PTA und BIUL) und "gap junctions" (E-PTA). Es zeigt sich, daß die agranulären Vesikel mit ZIO nicht elektronendicht imprägnierbar sind.

- 6) Die Durchlässigkeit der Septen (L.t.) für Procion Yellow liefert einen weiteren Beweis für die Existenz einer elektrotonischen Kopplung.
- 7) Erstmals gelang der elektronenoptische Nachweis von Neurofibrillen in den dorsalen Riesenaxonen (L.t.). Die Neurofibrillen sind aus Mikrotubuli und Neurofilamenten aufgebaut.

Die Befunde werden hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung bei der elektrischen Übertragung und als Indizien für das Vorliegen einer gemischten Synapse diskutiert.

LITERATUR

- Adam, H., Czihak, G.: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. Stuttgart, Fischer, 1964.
- Akert, K.: Struktur und Ultrastruktur von Nervenzellen und Synapsen. Klin. Wschr. 49, 509-519 (1971).
- Akert, K., Sandri, C.: An electron microscopic study of zinc iodide-osmium impregnation of neurons. I. Staining of synaptic vesicles at cholinergic junctions. Brain Res. 7, 286-295 (1968).
- Asada, Y., Bennett, M.V.L.: Experimental alteration of coupling resistance at an electrotonic synapse. J. Cell Biol. 49, 159-172 (1971).
- Bannister, L.H.: Lanthanum as an intracellular stain. J. Micr. 95, 413-419 (1971).
- Barlow, J., Martin, R.: Structural identification and distribution of synaptic profiles in the octopus brain using the zinc iodide-osmium method. Brain Res. 25, 241-253 (1971).
- Barr, L., Dewey, M.M., Berger, W.: Propagation of action potentials and the structure of the nexus in the cardiac muscle. J. gen. Physiol. 48, 797-823 (1965).
- Barr, L., Berger, W., Dewey, M.M.: Electrical transmission at the nexus between smooth muscle cells. J. gen. Physiol. 51, 347-368 (1968).
- Benedetti, E.L., Emmelot, P.: Hexagonal arrays of subunits in tight junctions separated from isolated rat liver plasma membranes. J. Cell Biol. 38, 15-24 (1968).
- Bennett, M.V.L.: A comparison of electrically and chemically mediated transmission. In: Pappas, G.D., Purpura, D.P.: Structure and function of synapses. New York, Raven Press, 1972, pp. 221-256.
- Bennett, M.V.L.: Permeability and structure of electrotonic junctions and intracellular movement of tracers. In: Kater, St.B.,

- Nicholson, Ch.: Intracellular staining in neurobiology. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1973, pp.115-134.
- Bennett, M.V.L., Auerbach, A.A.: Calculating of electrical coupling of cells separated by a gap. *Anat.Rec.* 163, 152 (1969).
- Bennett, M.V.L., Pappas, G.D., Gimenez, M., Nakajima, Y.: Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV) Medullary electromotor nuclei in Gymnotid fish. *J. Neurophysiol.* 30, 236-300 (1967).
- Bloom, F.E., Aghajanian, G.K.: Cytochemistry of synapses: Selective staining for electron microscopy. *Science* 154, 1575-1577 (1966).
- Bloom, F.E., Aghajanian, G.K.: Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J.Ultrastr.Res.* 22, 361-375 (1968).
- Boeckh, I., Sandri, C., Akert, K.: Sensorische Eingänge und synaptische Verbindungen im Zentralnervensystem von Insekten. *Z.Zellforsch.* 103, 429-446 (1970).
- Brightman, M.W., Reese, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J.Cell Biol.* 40, 648-677 (1969).
- Bryant, S.H.: Transmission in squid giant synapses. The importance of oxygen supply and the effect of drugs. *J.gen.Physiol.* 41, 473-484 (1958).
- Bullivant, S., Loewenstein, W.R.: Structure of coupled and uncoupled cell junctions. *J.Cell Biol.* 37, 621-632 (1968).
- Bullock, Th.H.: Functional organization of the giant fiber system of Lumbricus. *J. Neurophysiol.* 8, 55-71 (1945).
- Bullock, Th.H., Horridge, G.A.: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. San Francisco-London: Freeman 1965.
- Capaldi, R.A.: A dynamic model of cell membranes. *Sci.amer.*, march 1974, pp.27-33.
- Chalcroft, J.P.: An interpretation of cell membrane and junction

- structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. *J.Cell Biol.* 47, 49-60 (1970).
- Christoffersen, G.R.J., Miller, L.A.: Two types of excitatory activity recorded from the median giant fiber of the earthworm. *Acta physiol.scand.* 87, 425-427 (1973).
- Claparède, E.: Études anatomiques sur les annélides, turbellariés, opalines et grégaires observés dans les Hébrides. *Mém.Soc. Phys.Genève*, 16, 71-164 (1861).
- Coggeshall, R.E.: A fine structural analysis of the ventral nerve cord and associated sheath of *Lumbricus terrestris* L. *J.comp. Neurol.* 125, 393-438 (1965).
- Danielli, J.F., Davson, H.: A contribution to the theory of permeability of fine films. *J.cell.comp.Physiol.* 5, 495-508 (1935).
- Danilova, L.V., Rokhlenko, K.D., Bodryagina, A.V.: Electron microscopic study on the structure of septate and comb desmosomes. *Z.Zellforsch.* 100, 101-117 (1969).
- Davison, P.F.: Microtubules and neurofilaments: Possible implications in axoplasmic transport. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 2, 289-302 (1970).
- De Lorenzo, A.J.: The fine structure of synapses. *Biol.Bull.* 117, 390 (1959).
- Dennison, M.E.: Electron stereoscopy as a means of classifying synaptic vesicles. *J.Cell Sci.* 8, 525-539 (1971).
- De Robertis, E., Bennett, H.S.: Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Fed.Proc.* 13, 35 (1954).
- De Robertis, E., Bennett, H.S.: Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J.biophys.biochem. Cytol.* 1, 47-58 (1955).
- Dewey, M.M., Barr, L.: Intracellular connection between smooth muscle cells: the nexus. *Science* 137, 670-671 (1962).

- Dewey, M.M., Barr, L.: A study of the structure and distribution of the nexus. *J.Cell Biol.* 23, 553-585 (1964).
- Eccles, J.C., Granit, R., Young, I.Z.: Impulses in the giant nerve fibers of earthworms. *J.Physiol.(Lond.)* 77, 23P-25P (1933).
- Ehrenberg, C.G.: Beobachtung einer bisher unbekannten auffallenden Structur des Seelenorgans bei Menschen und Thieren. *Akad.wiss. Abh.phys.Kl. Berlin*, 1834.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E.: Tight intercellular junctions. Abstracts of papers presented at the First Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Chicago, November 2 to 4, 1961, 57.
- Farquhar, M.G., Palade, G.E.: Junctional complexes in various epithelia. *J.Cell Biol.* 17, 375-412 (1963).
- Farquhar, M.G., Palade, G.E.: Cell junctions in amphibian skin. *J.Cell Biol.* 26, 263-291 (1965).
- Fatt, P., Katz, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J.Physiol.(Lond.)* 117, 109-128 (1952b).
- Florey, E.: An introduction to general and comparative animal physiology. W.B. Saunders comp., Philadelphia-London, 1966.
- Florey, E.: Physiologie der Synapsen. *Verh.dtsch.zool.Ges.* 64, 186-201 (1970).
- Friedländer, B.: Beiträge zur Kenntnis des Centralnervensystems von Lumbricus. *Z.wiss.Zool.* 47, 47-48 (1888).
- Friedländer, B.: Über die markhaltigen Nervenfasern und Neurochorde der Crustaceen und Anneliden. *Mitt.Zool.Sta. Neapel*, 9, 205-265 (1889).
- Friedländer, B.: Altes und Neues zur Histologie des Bauchstranges des Regenwurms. *Z.wiss.Zool.* 58, 661-693 (1894).
- Friend, D.S., Gilula, N.B.: Variations in tight and gap junctions in mammalian tissue. *J.Cell Biol.* 53, 758-776 (1972).
- Froesch, D., Martin, R.: Heterogeneity of synaptic vesicles in the squid giant fibre system. *Brain Res.* 43, 573-579 (1972).

- Furshpan, E.J., Potter, D.D.: Transmission at the giant motor synapses of crayfish. *J. Physiol. (Lond.)* 145, 289-325 (1959).
- Gervasio, A., Martin, R., Miralto, A.: Fine structure of synaptic contacts in the first order giant fibre system of the squid. *Z. Zellforsch.* 112, 85-96 (1971).
- Gilula, N.B., Branton, D., Satir, P.: The septate junction: A structural basis for intercellular coupling. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 67, 213-220 (1970).
- Gilula, N.B., Satir, P.: Septate and gap junctions in molluscan gill epithelium. *J. Cell Biol.* 51, 869-872 (1971).
- Goodenough, D.A., Revel, J.-P.: The permeability of isolated and in situ mouse hepatic gap junctions studied with enzymatic tracers. *J. Cell Biol.* 50, 81-91 (1971).
- Gray, E.G.: Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J. Anat. (Lond.)* 97, 101-106 (1963).
- Gray, E.G., Guillery, R.W.: Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. *Intern. Rev. Cytol.* 19, 111-182 (1966).
- Grinell, A.D.: A study of the interaction between motoneurons in the frog spinal cord. *J. Physiol. (Lond.)* 182, 612-648 (1966).
- Günther, J.: Der cytologische Aufbau der dorsalen Riesenfasern von Lumbricus terrestris L. *Z. wiss. Zool.* 183, 51-70 (1971).
- Günther, J., Schürmann, F.W.: Zur Feinstruktur des dorsalen Riesenfasersystems im Bauchmark des Regenwurms. II. Synaptische Beziehungen der proximalen Riesenfaserkollateralen. *Z. Zellforsch.* 139, 369-396 (1973).
- Günther, J., Walther, J.B.: Funktionelle Anatomie der dorsalen Riesenfaser-Systeme von Lumbricus terrestris L. (Annelida, Oligochaeta). *Z. Morph. Tiere*, 70, 253-280 (1971).
- Hama, K.: Some observations on the fine structure of the giant fibers of earthworm, Eisenia foetida. *J. biophys. biochem. Cytol.* 6, 61-66 (1959).

- Hama, K.: Some observations on the fine structure of the giant fibers of the crayfishes (Cambarus virilus and Cambarus clarkii) with special reference to the submicroscopic organization of the synapses. Anat.Rec. 141, 275-293 (1961).
- Hamaker, J.I.: The nervous system of Nereis virens SARS. A study in comparative neurology. Bull.Mus.comp.Zool.Harv. 32, 89-124 (1898).
- Horridge, G.A., MacKay, B.: Naked axons and symmetrical synapses in coelenterates. Quart.J.micr.Sci. 103, 531-541 (1962).
- Hubbard, J.I.: Mechanism of transmitter release from nerve terminals. Ann.N.Y.Acad.Sci. 183, 131-146 (1971).
- Hudspeth, A.J., Revel, J.-P.: Coexistence of gap and septate junctions in an invertebrate epithelium. J.Cell Biol. 50, 93-101 (1971).
- Huxley, H.E., Zubay, G.: Preferential staining of nucleic-acid-containing structures for electron microscopy. J.biophys.biochem.Cytol. 11, 273-296 (1961).
- Issidorides, M.: Ultrastructure of the synapse in the giant axons of the earthworm. Exp.Cell Res. 11, 423-436 (1956).
- Iha, R.K., Mackie, G.O.: The recognition, distribution, and ultrastructure of hydrozoan nerve elements. J.Morph. 123, 43-62 (1967).
- Johnson, G.E.: Giant nerve fibres in crustaceans with special reference to Cambarus and Palaemonetes. J.comp.Neurol. 36, 323-373 (1924).
- Kao, C.Y., Grundfest, H.: Postsynaptic electrogenesis in septate giant axons. I. Earthworm median giant axon. J.Neurophysiol. 20, 553-573 (1957).
- Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 27, 137A-138A (1965).
- Katz, B.: The release of neural transmitter substances. Liverpool: Liverpool Univ. Press, 1969.

- Keferstein, W.: Untersuchungen über niedere Seethiere. Z.wiss. Zool. 12, 1-147 (1863).
- Koelle, G.B.: Current concepts of synaptic structure and function. Ann.N.Y.Acad.Sci. 183, 5-20 (1971).
- Lamparter, H.E., Steiger, U., Sandri, C., Akert, K.: Zum Feinbau der Synapsen im Zentralnervensystem der Insekten. Z.Zellforsch. 19, 435-442 (1969).
- Lehninger, A.L.: The neuronal membrane. Proc.nat.Acad.Sci.(U.S.) 60, 1069-1080 (1968).
- Leydig, F.: Vom Bau des thierischen Körpers. Handbuch der vergleichenden Anatomie, Bd.1 (1864a).
- Leydig, F.: Über den Phreoryctes menkeanus Hofm. nebst Bemerkungen über den Bau anderer Anneliden. Arch.mikr.Anat. 1, 249-294 (1865).
- Leydig, F.: Die riesigen Nervenröhren im Bauchmark der Ringelwürmer. Zool.Anz. 9, 591-597 (1886).
- Locke, M.: The structure of septate desmosomes. J.Cell Biol. 25, 166-169 (1965).
- Loewenstein, W.R., Kanno, Y.: Studies on an epithelial (gland) cell junction I. Modifications of surface membrane permeability. J.Cell Biol. 22, 565-586 (1964).
- Loewenstein, W.R., Nakas, M., Socolar, S.J.: Junctional membrane uncoupling: permeability transformations at a cell membrane junction. J.gen.Physiol. 50, 1865 (1967).
- Luft, H.J.: Permanganate - a new fixative for electron microscopy. J.biophys.biochem.Cytol. 2, 799-801 (1956).
- Martin, R., Barlow, J., Miralto, A.: Application of the zinciodide-osmium tetroxide impregnation of synaptic vesicles in cephalopod nerves. Brain Res. 15, 1-16 (1969).
- McNutt, N.S., Weinstein, R.S.: The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. J.Cell Biol. 47, 666-688 (1970).

- Mulloney, B.: Structure of the giant fibres of the earthworms. *Science* 168, 994-996 (1970).
- Myhrberg, H.E.: Ultrastructural localization of monoamines in the central nervous system of Lumbricus terrestris (L.) with remarks on neurosecretory vesicles. *Z.Zellforsch.* 126, 348-362 (1972).
- Nachmansohn, D.: Proteins in bioelectricity. Acetylcholine-esterase and -receptor. In: *Handbook of sensory physiology*, vol. I, pp. 18-102. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1971.
- Nevmyvaka, G.A.: The structure of nerve fibers in Allolobophora. *C.R.Acad.Sci.USSR. (Dokl.Akad.Nauk SSSR)* 70, 507-510 (1950).
- Newell, P.F., Skelding, J.M.: Structure and permeability of the septate junction in the kidney sac of Helix pomatia L. *Z.Zellforsch.* 147, 31-39 (1973).
- Nicol, J.A.C.: The giant axons of annelids. *Quart.Rev.Biol.* 23, 291-323 (1948).
- Ogawa, F.: The nervous system of earthworm (Pheretima communissima) in different ages. *Sci.Rep.Tohoku Univ.* (4) 13, 395-488 (1939).
- Oliveira-Castro, G., Loewenstein, W.R.: Junctional membrane permeability: Effects of divalent cations. *J.Membr.Biol.* 5, 51-77 (1971).
- Overton, J.: Localized Lanthanum staining of the intestinal brush border. *J.Cell Biol.* 38, 447-452 (1968).
- Palade, G.E.: A study of fixation for electron microscopy. *J.exp.Med.* 95, 285-297 (1952).
- Pappas, G.D., Asada, Y., Bennett, M.V.L.: Morphological correlates of increased coupling resistance at an electrotonic synapse. *J.Cell Biol.* 49, 173-188 (1971).
- Pappas, G.D., Purpura, D.P.: Structure and function of synapses. New York, Raven Press, 1972.
- Pappas, G.D., Waxman, St.G.: Synaptic fine structure - morphological

- correlates of chemical and electrotonic transmission. In:
Pappas, G.D., Purpura, D.P.: Structure and function of synapses.
New York, Raven Press, 1972, pp.1-43.
- Payton, B.W., Bennett, M.V.L., Pappas, G.D.: Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse. *Science* 166, 1641-1643 (1969).
- Peracchia, C.: Low resistance junctions in crayfish. I. Two arrays of globules in junctional membranes. *J.Cell Biol.* 57, 54-65 (1973).
- Perracchia, C.: Low resistance junction in crayfish. II. Structural details and further evidence for intercellular channels by freeze-fracture and negative staining. *J.Cell Biol.* 57, 66-76 (1973).
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H.de F.: The fine structure of the nervous system. The cells and their processes. New York-Evaston-London. Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1972.
- Pfeffinger, K.H.: Synaptic morphology and cytochemistry. Progress in histochemistry and cytochemistry, vol.5 no 1, Stuttgart-Portland-Oregon-USA, Fischer, 1973.
- Pfeffinger, K.H.: Persönliche Mitteilung, 1975.
- Porter, K.R.: Cytoplasmic microtubules and their function. In: Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M.: Principles of biomolecular organization. London, Churchill, 1966, pp.308-345.
- Reinert, J., Ursprung, H.: Origin and continuity of cell organelles. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1971.
- Revel, J.-P., Karnovsky, M.J.: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J.Cell. Biol.* 33, C7-C12 (1967).
- Revel, J.-P., Ito, S.: The surface components of cells. In: Davis and Warren (Eds.): The specificity of cell surfaces, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1967, pp.211-234.
- Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J.Cell Biol.* 17, 208-212 (1963).

- Richardson, K.C., Garret, L., Finke, E.H.: Embedding in epoxy resin for ultrathin sections in electron microscopy. *Stain Technol.* 35, 313-323 (1960).
- Robertson, J.D.: Recent electron microscope observations on the ultrastructure of the crayfish median-to-motor giant synapse. *Exp. Cell Res.* 8, 226-228 (1955).
- Robertson, J.D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* 16, 3-43 (1959).
- Robertson, J.D.: The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in Mauthner cell synapses in goldfish brains. *J. Cell Biol.* 19, 201-232 (1963).
- Robertson, J.D.: Unit membranes: A review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes. In: Locke, M. (Ed.): *Cellular membranes in development*. New York, Academic Press, 1964, pp. 1-81.
- Robertson, J.D.: The ultrastructure of synapses. The neurosciences. Second study program. New York, Rockefeller Univ. Press, 1970, pp. 715-728.
- Robertson, J.D., Bodenheimer, T.S., Stage, D.E.: The ultrastructure of Mauthner cell synapses and nodes in goldfish brains. *J. Cell Biol.* 19, 159-199 (1963).
- Rose, B.: Intercellular communication and some structural aspects of membrane junctions in a simple cell system. *J. Membr. Biol.* 5, 1-19 (1971).
- Rose, B., Loewenstein, W.R.: Junctional membrane permeability. *J. Membr. Biol.* 5, 20-50 (1971).
- Rushton, W.A.H.: Action potentials from isolated nerve cord of the earthworm. *Proc. roy. Soc. B* 132, 423-437 (1945).
- Rushton, W.A.H., Barlow, H.B.: Single-fibre response from an intact animal. *Nature* 152, 597-598 (1943).

- Ruthmann, A.: Methoden der Zellforschung. Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung, W.Keller & Co., 1966.
- Smallwood, W.M., Holmes, M.T.: The neurofibrillar structure of the giant fibers in Lumbricus terrestris and Eisenia foetida. J. comp. Neurol. 43, 327-345 (1927).
- Scharrer, B.: Neurohumors and neurohormones: Definitions and terminology. J. neuro-visc. Rel. Suppl. IX, 1-20 (1969).
- Scharrer, E., Scharrer, B.: Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biol. Rev. 12, 185-216 (1937).
- Schneider, K.C.: Lehrbuch der vergleichenden Histologie der Tiere. Jena, Fischer, 1902.
- Schultze, H.: Die fibrillären Strukturen der Nerven Elemente bei Wirbellosen. Arch. mikr. Anat. 16, 57-111 (1879).
- Staubesand, J., Kuhlo, B., Kersting, K.H.: Licht- und elektronenmikroskopische Studien am Nervensystem des Regenwurms. I. Mitt. Die Hüllen des Bauchmarks. Z. Zellforsch. 61, 401-433 (1963).
- Stensaas, L.J., Stensaas, S.S.: Light and electron microscopy of motoneurons and neuropil in the amphibian spinal cord. Brain Res. 31, 67-84 (1971).
- Stirling, Ch.A.: The ultrastructure of giant fiber and serial synapses in crayfish. Z. Zellforsch. 131, 31-45 (1972).
- Stough, H.B.: Giant nerve fibres of the earthworm. J. comp. Neurol. 40, 409-463 (1926).
- Stretton, A.O.W., Kravitz, E.A.: Neuronal geometry: Determination with a technique of intracellular dye injection. Science 162, 132-134 (1968).
- Taylor, W.G.: The optical properties of the earthworm giant fiber sheath as related to fiber size. J. cell. comp. Physiol. 15, 363-371 (1940).
- Vollrath, L.: Über die neurosekretorische Innervation der Adeno-

- .hypophyse von Teleostiern, insbesondere von Hippocampus kuda und Tinca tinca. Z.Zellforsch. 78, 234-260 (1967).
- Westfall, J.A., Yamataka, S., Enos, P.D.: Ultrastructural evidence of polarized synapses in the nerve net of Hydra. J.Cell Biol. 51, 318-323 (1971).
- Whittaker, V.P.: The vesicle hypothesis. In: Excitatory synaptic mechanisms. Oslo-Bergen-Tromsø, Universitetsforlaget, 1970, pp.67-76.
- Wiener, J., Spiro, D., Loewenstein, W.R.: Studies on an epithelial (gland) cell junction. II. Surface structure. J.Cell Biol. 22, 587-598 (1964).
- Wilson, D.M.: The connections between the lateral giant fibres of earthworms. J.Biochem.Physiol. 3, 274-284 (1961).
- Wood, R.L.: Intercellular attachment in the epithelium of Hydra as revealed by electron microscopy. J.biophys.biochem.Cytol. 6, 343-352 (1959).

ABBILDUNGSLEGENDE

Abb. 1: Aufsicht auf die Versuchsanordnung zur iontophoretischen Applikation von Procion Yellow (Text S.8).

BM = Bauchmark

DW = Dentalwachs

KD = Kupferdraht

PÖ = Paraffinöl

PY = Procion Yellow

V = Vertiefung

Abb. 2: Die dorsalen Riesenfasern der Lumbriciden:

a) Semidünnschnitt (2 μ m dick) durch das Bauchmark von Lumbricus terrestris auf Ganglienhöhe. In der medianen Riesenfaser (m.R.F.) und der rechten lateralen Riesenfaser (l.R.F.) ist ein Septum (S) ausgebildet. Färbung: Azur-II-Methylenblau nach Richardson et al. (1960).

b) Schema des Septenverlaufs in der mittleren (m.R.F.) und in den lateralen Riesenfasern (l.R.F.): ANT = anterior, POST = posterior.

A) Längsschnitt: Die Septen (S $\rightarrow$ $\leftarrow$) bestehen aus dem Axolemm benachbarter Axonabschnitte (Ax₁ hell, Ax₂ punktiert) und dem dazwischenliegenden extrazellulären Raum (eR). Die lateralen Septen verlaufen von rostradorsal nach caudoventral, das mediane Septum umgekehrt von caudoventral nach rostradorsal.

B) Querschnitte: Der Schnitt auf Höhe I von A) zeigt die Anfangsregion der Septen, der Schnitt auf Höhe II von A) die Endregion. Die lateralen Septen sind von rostradorsolateral (I) nach caudoventromedian (II) gegen die Sagittalebene geneigt. Die Neigung ist dadurch bedingt, daß der von median her neu eintretende Axon der lateralen Riesenzelle das auslaufende Riesenfaserlumen nach dorsolateral verdrängt (Günther, 1971). (Schema verändert nach Stough, 1926).

- c) Semidünnschnitt (2 μ m dick) durch das Septum einer lateralen Riesenfaser von Lumbricus terrestris. Die Ventralseite (v) mit dichterem Cytoplasma färbt sich stärker an als die Dorsal-seite (d). Färbung: 0,1% Toluidinblau in 2,5% Na_2CO_3 .

Abb. 3: Laterale Riesenfaser von Lumbricus terrestris:

- a) Längsschnitt: Das gefaltete Septum (Se) verläuft von Glia zu Glia (G) der Riesenfaserhülle. Ein längs getroffener Fibrillenstrang (F) zieht von posterior (POST) bis dicht an das Septum. Transseptal (nach anterior) ist ein quergetroffenes Fibrillenfeld (F) erkennbar.
- b) Ansatzstelle des Septums (Se) an der Gliahülle (G): Zwei Riesenaxonabschnitte mit eng an die Glia angeschmiegtten Axonmembranen (AM_1 und AM_2) stoßen an den Enden zur Septenbildung zusammen, ohne daß Gliamaterial in den Septalspalt eingelagert wird. Die Glialamellen (GL) sind mehr oder weniger dicht gepackt und stellenweise desmosomenartig verdickt (D).

Abb. 4: Querschnitt durch das mediane Riesenfaserseptum mit verschiedenen Normalfixierungen. Die beiden benachbarten Axonmembranen zeigen in allen drei Fällen den typischen trilaminaren Aufbau (dunkel-hell-dunkel) der Einheitsmembranen (EM).

- a) Lumbricus terrestris: Fixierung: Glutardialdehyd/Formaldehyd-Gemisch nach Karnovsky (1965).
- b) Lumbricus terrestris: Fixierung: OsO_4 nach Palade (1952).
- c) Eisenia foetida: 5% Glutardialdehyd/ OsO_4 .

Abb. 5: Septumquerschnittsbereiche mit Membranappositionen (Pfeile):

In a) und c) wird der synaptische Spalt (sS) zwischen zwei Membranappositionen durch mäßig elektronendichtes Material überbrückt. In b) und d) ist eine deutliche "Septierung" des Spalts zwischen zwei Membranappositionen zu erkennen. In d) ist die Kontinuität zwischen Membranappositionen und Spaltstruktur deutlich sichtbar (X).

- a) Lumbricus terrestris, medianes Septum,
b) Lumbricus terrestris, laterales Septum,
c) Eisenia foetida, medianes Septum,
d) Eisenia foetida, medianes Septum.

Abb. 6: Medianes Riesenfaserseptum von Eisenia foetida:

- a) Flächenschnitt parallel zu den Septalmembranen durch das Septum: Zwischen der Ventralseite (dichteres Plasma, unten) und der Dorsalseite (oben) erscheint ein hexagonal angeordnetes Muster dunkler, rundlicher Flecken (Pfeil), das den synaptischen Spalt und die Membranappositionen repräsentiert. Dieses Muster ist mit dem Querschnittsmuster von Abb.5c,5d korrelierbar.
- b) Schrägschnitt: Das hell-dunkle Streifenmuster (Pfeile) entspricht der Spalttextur von a). Rechts oben: Übergang in einen Flächenschnitt auf Höhe der Axonmembran (*), bei (†) ist das Septum annähernd quer getroffen.
- c) Ausnahmefund: Unregelmäßig wabenförmiges Muster (Pfeil) an einem flach geschnittenen medianen Septum von Lumbricus terrestris. Im Gegensatz zu a) ist der Kern einer Zelle hell, die Wand dunkel. Das Sternchen deutet auf eine Zelle mit dunklem Fleck im hellen Kern hin.

Abb. 7: Lumbricus terrestris: a) laterales, b)c) medianes Septum, Eisenia foetida: d) medianes Septum.

- a)b) Elektronendichte Auflagerungen der Membranen auf der cytoplasmatischen Seite (cM) und ein erweiterter Spalt (sS) ohne besondere Strukturierung ergeben "intermediate junctions" (ij).
- c) "Dense projection"-ähnliche Höcker (Pfeile) auf der Dorsalseite und
- d) etwas kleinere Höcker auf der Ventralseite des Septums.

Abb. 8: E-PTA-Imprägnation:

- a) Übersicht über die Verteilung von "intermediate junctions" (ij) in der Nähe der Glia-scheide (G) im Bild links unten an einem lateralen Septum von Lumbricus terrestris.
- b) Die Vergrößerung zeigt den symmetrischen Aufbau der "intermediate junctions" (ij) mit stärkeren cytoplasmatischen Membranbelägen ("internal fuzz coats", -ifc) und schmalen extrazellulären Membranauflagerungen ("external fuzz coats", -efc) zwischen denen gelegentlich ein Restspalt erkennbar ist. Die Axonmembranen (IM) bleiben hell.

- c) Zwei "intermediate junctions" (ij) mit besonders stark entwickeltem "internal fuzz coat" (ifc). Zwischen beiden verlaufen als Verbindung die "external fuzz coats" (efc) mit breiterem Spalt dazwischen (Pfeile). Lumbricus terrestris, medianes Septum.
- d) Links das bekannte Bild einer "intermediate junction" (ij), rechts ein abweichendes Imprägnationsmuster: Der "internal fuzz coat" (ifc) besteht aus einer feinen Linie mit stellenweise aufgesetzten Höckern (Pfeile), die den Membranappositionen aus Abb.5 vergleichbar sind. Der "external fuzz coat" (efc) ist nur stellenweise als feine Linie zu erkennen.
Lumbricus terrestris, laterales Septum.

Abb. 9: E-PTA-Imprägnation:

- a) Über den schmalen cytoplasmatischen "fuzz coats" (ifc) an einem medianen Riesenfaserseptum von Lumbricus terrestris erheben sich Höcker (Pfeile), die mit denen aus Abb.8d (rechts) und Abb.5 vergleichbar sind.
- b) Flachschnitt durch ein medianes Septum von Lumbricus terrestris: Die nicht ideal quer getroffenen, annähernd sechseckigen Flecken (X) sind hexagonal angeordnet (vgl.Abb.6a). Gelegentlich ist ihr Zentrum deutlich dunkler (Pfeile).

Abb.10: BIUL-Imprägnation:

- a) Die Ausbildung des "internal fuzz coat" (ifc) an einer "intermediate junction" (ij) ist stellenweise noch stärker als nach E-PTA-Imprägnation, ansonsten ist das Imprägnationsmuster identisch mit dem von E-PTA (vgl.Abb.8). Lumbricus terrestris, medianes Septum.
- b) Weite Ausdehnung einer "intermediate junction" (ij) mit weniger stark entwickeltem "internal fuzz coat" (ifc). Lumbricus terrestris, medianes Septum.
- c) Ausbildung von "dense projection"-ähnlichen Höckern (Pfeile) auf der Dorsalseite eines medianen Septums von Lumbricus terrestris. Ventral ist hier der "internal fuzz coat" (ifc) schwach ausgebildet.

- d) Dorsale (unten) und ventrale (oben) Ansammlungen synaptischer Vesikel (sV) an einem medianen Septum von Lumbricus terrestris. Die "internal fuzz coats" tragen "dense projection"-ähnliche Höcker (Pfeile).

Abb.11: Schematische Darstellung typischer Spezialisierungen des Riesenfaserseptums nach E-PTA- (11a,11b) und BIUL-Imprägnierung (11d,11e):

- a)d) "Intermediate junctions",
b) Septalbereich mit Membranappositionen,
e) "Dense projection"-ähnliche Höckerstruktur mit beidseitigen Vesikelansammlungen.

Im Vergleich dazu das Bild einer chemisch übertragenden Synapse nach E-PTA- (c) und BIUL-Impregnation (f) (nach Pfenninger, 1973, verändert):

- 1 Axoplasma
- 2 "internal fuzz coat"
- 3 Einheitsmembran
- 4 "external fuzz coat"
- 5 synaptischer Spalt
- 6 synaptische Vesikel

Abb.12: Lanthanimpregnation:

- a) Querschnitt durch ein medianes Riesenfaserseptum (Se) von Lumbricus terrestris: Der extrazelluläre Spalt (sS) ist nicht imprägniert.
- b) Längsschnitt durch das Darmepithel von Lumbricus terrestris: Imprägnierte Interzellularräume (IR) sind elektronendicht (Pfeile). Der Zellinhalt erscheint diffus grau (*). L = Darmlumen.

Abb.13: Rekonstruktion des Septalkomplexes:

- A) Aufsicht auf den Septalkomplex nach Normalfixierung: Globuläre Strukturen (Gb) aus Membranappositionen (MA) und den Spalt überbrückenden "Septen" (S) stecken in den Einheitsmembranen (EM). sS = Septalspalt.

Querschnitt (unten): Die Kreise repräsentieren die quer getroffenen Globuli (Gb), die gestrichelten Sechsecke den extrazellulären Raum (eR); sie stellen Einheitszellen dar.

- B) Räumliche Rekonstruktion des Septalkomplexes nach Normalfixierung: Links sind zwei Globuli eingezeichnet, von denen nur die unteren Membranappositionen (MA) ausgezeichnet sind.
- C) Wie B), jedoch nach E-PTA-Imprägnation: Die Globuli unterscheiden sich durch ihre sechseckige Form und gelegentlich sichtbare zentrale runde Flecken (zF).

Zeichenerklärung: Globuli: dicht punktiert,

Einheitsmembranen: locker punktiert,

Septalspalt: hell.

Beschriftung in B) und C) wie A).

Abb.14: Vesikelanhäufungen:

- a) Vesikel (sV), dorsal (oben) und ventral (unten) eines medianen Septums von Lumbricus terrestris. Der Pfeil verweist auf eine Verbindungsstruktur zwischen zwei Vesikeln, die Sternchen auf "dense core vesicles", das Doppeldreieck auf den dreischichtigen Aufbau der Axonmembranen.
- b) Nur ventral (oben) gelegene Vesikelansammlung mit vorwiegend klaren Vesikeln (sV) und wenigen "dense core vesicles" (✱) an einem lateralen Septum von Lumbricus terrestris. Der synaptische Spalt ist leicht erweitert, die Septalmembranen (Pfeile) sind etwas stärker elektronendicht.
- c) Paariger, ventral (unten) und dorsal (oben) gelegener Vesikelhaufen an einem medianen Septum von Eisenia foetida. Die Sternchen weisen auf "dense core vesicles" hin.
- d) Einseitig (ventral) gelegener Vesikelhaufen (links) und paariger Vesikelhaufen mit wenigen dorsalen Vesikeln (sV) an einem medianen Septum von Eisenia foetida. Der Unterschied in der Plasmadichte dorsal (oben) und ventral (unten) kommt hier deutlich zum Ausdruck.

Abb.15: Ausschnitt aus einem medianen Riesenfaserseptum von Lumbricus terrestris mit beidseitigen Vesikelansammlungen (sV), wenigen

"dense core vesicles" (*), verdickten Membranabschnitten (Pfeil) und erweitertem Spalt (Doppelpfeil). m = Mitochondrien.

Abb.16: ZIO-Imprägation:

- a) Durch ZIO nicht geschwärzte Vesikel (sV) in zwei dorsal eines mittleren Riesenfaserseptums gelegenen Ansammlungen. Vereinzelt treten deformierte Vesikel auf (Pfeil). Lumbricus terrestris.
- b) Ventral gelegener Vesikelhaufen an einem medianen Septum von Lumbricus terrestris mit dem am stärksten erreichten Imprägnierungsgrad.

Abb.17: Graphische Darstellung der mittleren Vesikeldurchmesser aus Summen- und Einzelhaufenmessungen: Die hellen Säulen stehen für dorsale (d), die dunklen für ventrale (v) Vesikelhaufen. Paarige Vesikelpopulationen sind als Doppelsäulen dargestellt, ebenso die Summe aller erfaßten Vesikeldurchmesser als erstes Säulenpaar.

Abszisse: Summe (Σ) aller dorsalen (d) und ventralen (v) Einzelhaufen und laufende Nummer (X) der Einzelpopulationen nach Tabelle 2 und 3.

Ordinate: Vesikeldurchmesser in μ .

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung, n = Anzahl der Vesikel.

- A) Lumbricus terrestris, medianes Septum,
- B) Lumbricus terrestris, laterales Septum,
- C) Eisenia foetida, medianes Septum.

Abb.18: Häufigkeitsverteilung der Summe aller Vesikel nach Größenklassen (GK) (vgl. Tabelle 4). Die hellen Säulen stehen für dorsale Vesikel, die dunklen für ventrale. n = Anzahl der Vesikel.

- A) Lumbricus terrestris, medianes Septum,
- B) Lumbricus terrestris, laterales Septum,
- C) Eisenia foetida, medianes Septum.

Abb.19: Schemata von der Verteilung der verschiedenen an den Riesenfasersepten gefundenen Differenzierungen, aufgezeigt anhand

typischer Septalquerschnitte:

- A) Lumbricus terrestris: Septum einer medianen Riesenfaser mit Vesikelansammlungen, "intermediate junctions" und Spalterweiterungen; Mitochondrien sind auf der ventralen Seite häufig zahlreicher als auf der dorsalen (vgl. B) und C)).
- B) Lumbricus terrestris: Septum einer lateralen Riesenfaser mit "intermediate junctions", "septierten" Abschnitten mit Membranappositionen und dem seltenen Fall von Gliaresten im Spalt (punktiert).
- C) Eisenia foetida: Septum einer lateralen Riesenfaser mit "septierten" Abschnitten mit Membranappositionen.

Procion Yellow Iontophorese: Lumbricus terrestris:

Abb.20: Beispiel für die Anfärbung einer medianen Riesenfaser:

- a) Interseptaler Bereich kurz vor dem Septum, die mediane Riesenfaser ist stark angefärbt.
- b) Septalregion, mittlerer Bereich: Wie die im Vergleich zur ventralen Seite (v) schwache aber dennoch merkliche Farbstoffkonzentration im dorsalen (d) transseptalen Bereich zeigt, ist das (nicht sichtbare) Septum für Procion Yellow permeabel.
- c) Septalregion, kurz vor dem Ende.

Abb.21: Beispiel für die Anfärbung einer lateralen Riesenfaser:

- a) Ausschnitt aus dem mittleren Septalbereich mit Septen in beiden lateralen Riesenfasern: Hier ist die Dorsalseite (d) stärker angefärbt als die ventrale (v) transseptale Region.
- b) Eintritt des Riesenaxons in die linke laterale Riesenfaser (X).
- c) Kontrollpräparat: Der Querschnitt aus dem Septalbereich eines nicht angefärbten Bauchmarks zeigt die grüne Eigenfluoreszenz des Gewebes. Das Septum (Se) der rechten lateralen Riesenfaser ist als dünne Linie erkennbar.

Abb.22: Neurofibrillen:

- a) Der Querschnitt durch eine mediane Riesenfaser von Lumbricus terrestris zeigt die Neurofibrillen im elektronenmikrosko-

pischen Bild: Einsatz: Gewundene Bündel parallel verlaufender Neurofilamente und Mikrotubuli.

- b) Querschnitt durch ein Bündel von Mikrotubuli (MT). Gelegentlich ist die elektronendichte Tubuliwand und der dunkle zentrale Kern zu erkennen (Pfeil).

Abb.23: Schematische Darstellung der Baupläne der "septate junction" (A) und der "gap junction" (B-D) in der Aufsicht (0°) und im Querschnitt (90°):

Beiden Zellkopplungstypen liegt die hexagonale Anordnung der Bauelemente zugrunde. Dies gibt in der Aufsicht ein Wabenmuster (oberer Teil der Abbildungen) im Querschnitt eine Leiterstruktur (unterer Teil der Abbildungen). Der Unterschied der beiden Kopplungstypen besteht in der Zuordnung von Leitungs- (Ionenpermeabilität) und Isolationsfunktion zu den einzelnen Strukturen.

Zeichenerklärung: Isolierende Elemente: dicht punktiert,
Extrazellulärraum mit Leitungsfunktion: gestreift,
Extrazellulärraum ohne Leitungsfunktion: hell,
Einheitsmembranen (Zusatzschema bei C) und D):
locker punktiert.

A) "Septate junction":

Das hexagonal angeordnete Kanalsystem überbrückt den extrazellulären Spalt (S) und steht senkrecht auf den Membranen der beiden gekoppelten Zellen. Die isolierende Wabenwand (WW) umhüllt den Ionenpermeablen Kanal, den Wabenkern (WK). Die Wabenwand (WW) der Aufsicht und das "Septum" (Se) des Querschnitts repräsentieren identische Strukturen, ebenso der Wabenkern (WK) der Aufsicht und der extrazelluläre Raum (eR) im Spalt (S) des Querschnitts.

Bei diesem Kopplungstyp ist also der durch den Wabenkern dargestellte Extrazellulärraum der Ionenpermeable Teil.

(Nach Bullivant und Loewenstein, 1968, verändert).

(Zur Frage der physiologischen Bedeutung der "septate junctions" vgl. S.35).

B) "Gap junction":

Die Einheitszelle ist hier wie in A) die Wabe mit Wand (WW) und Kern (WK). Im Gegensatz zu A) ist der Wabenkern (WK) hier jedoch isolierend. Den Ionenpermeablen Teil dieses Kopplungstyps repräsentieren die im Vergleich zu A) neu hinzukommenden kleinen, interzellulären Kanäle (ca 20 Å) (IK), die als durchgehende Verbindungsstücke zwei Zellen syncytial koppeln. Die Wabenkerne (WK) sind eingebettet in ein extrazelluläres Kanalsystem, das den Wabenwänden (WW) entspricht und nichts mit der interzellulären Kopplung zu tun hat. Entsprechend anders ist die Zuordnung von Strukturen der Aufsicht und des Querschnitts: Hier sind Wabenwand (WW) und Extrazellularraum (eR) identisch, sowie Wabenkern (WK) und "Septum" (Se).
(Nach Payton, Bennett und Pappas, 1969, verändert).

C) "Gap junction":

Im Prinzip wie B), jedoch sind hier die isolierenden Wabenkerne (WK) als transseptale Globuli mit cytoplasmatischen Vorsprüngen ausgebildet (Zusatzschema, ganz unten).
(Nach Peracchia, 1973, II, verändert).

D) "Gap junction": (nach E-PTA-Daten)

Die "septierten" Abschnitte mit Membranappositionen der dorsalen Riesenfasersepten der Lumbriciden sind aufgrund der Wabenstruktur der Aufsicht und der globulären Strukturen des Querschnitts zum "gap junction"-Typ Modell C) zuzurechnen. (Zusatzschema, ganz unten; vgl. auch die Schemata der Abb. 13, 19B, 19C).

(Zur physiologischen Bedeutung der "gap junctions" vgl. S. 32 f.)

PROCION YELLOW-IONTOPHORESE
 VERSUCHSANORDNUNG
 - AUFSICHT -

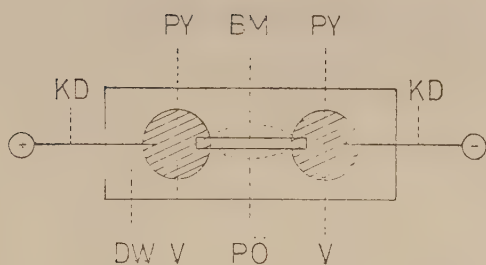
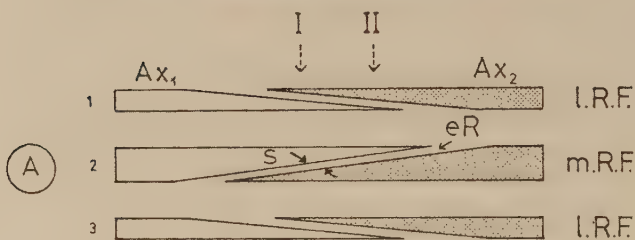
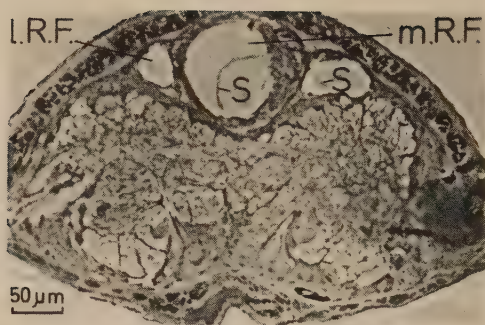
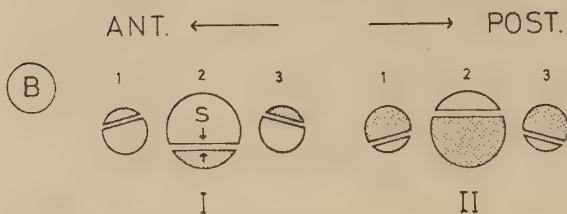


Abb.1

(a)



(b)



(c)

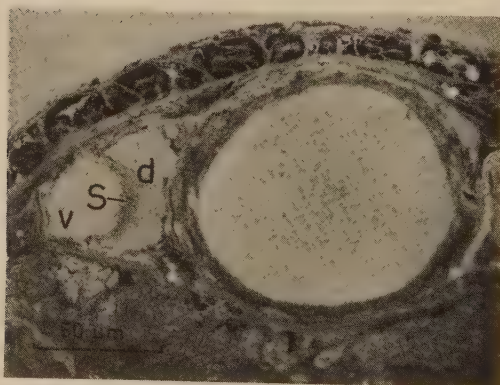


Abb. 2

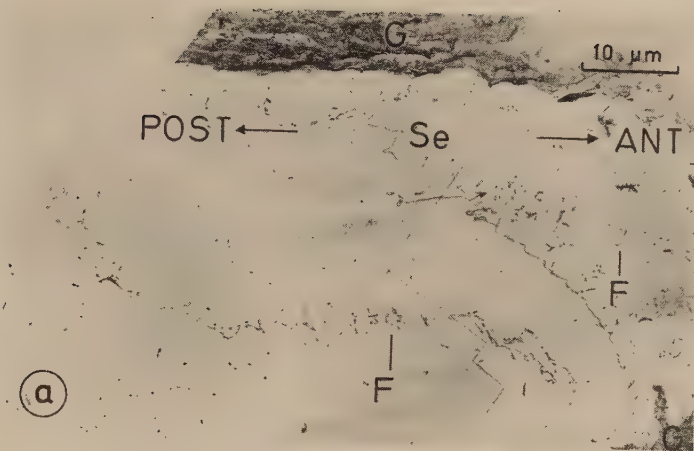


Abb. 3

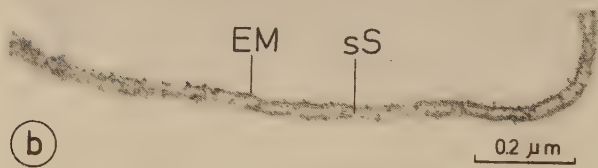
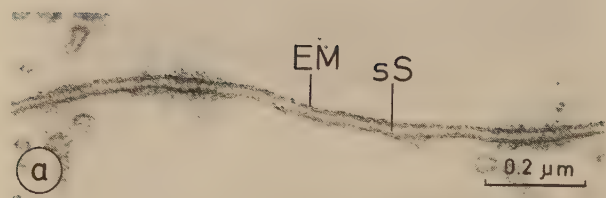


Abb. 4

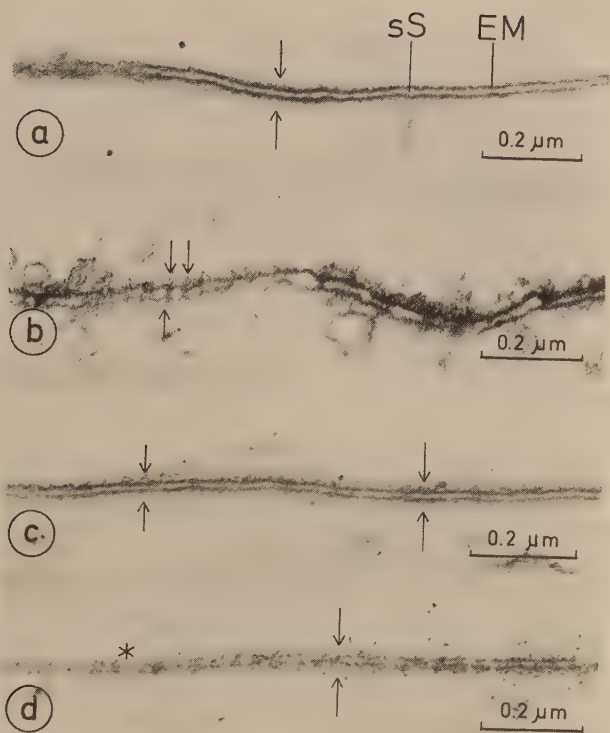


Abb. 5

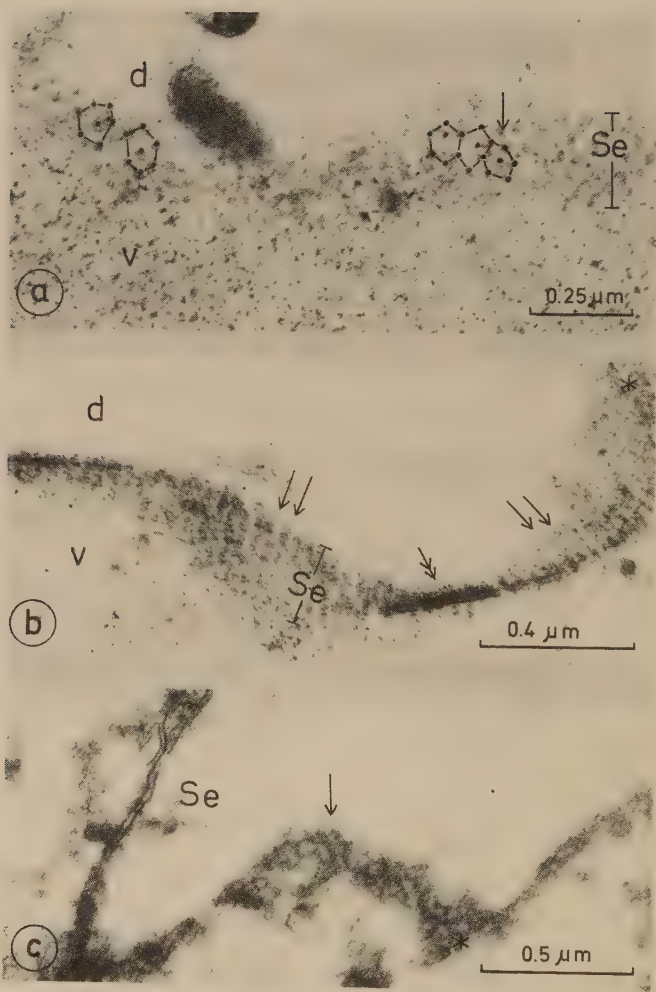


Abb. 6

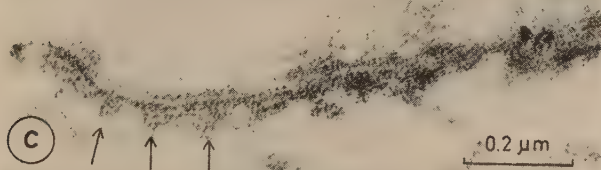


Abb. 7

E - PTA-IMPREGNATION

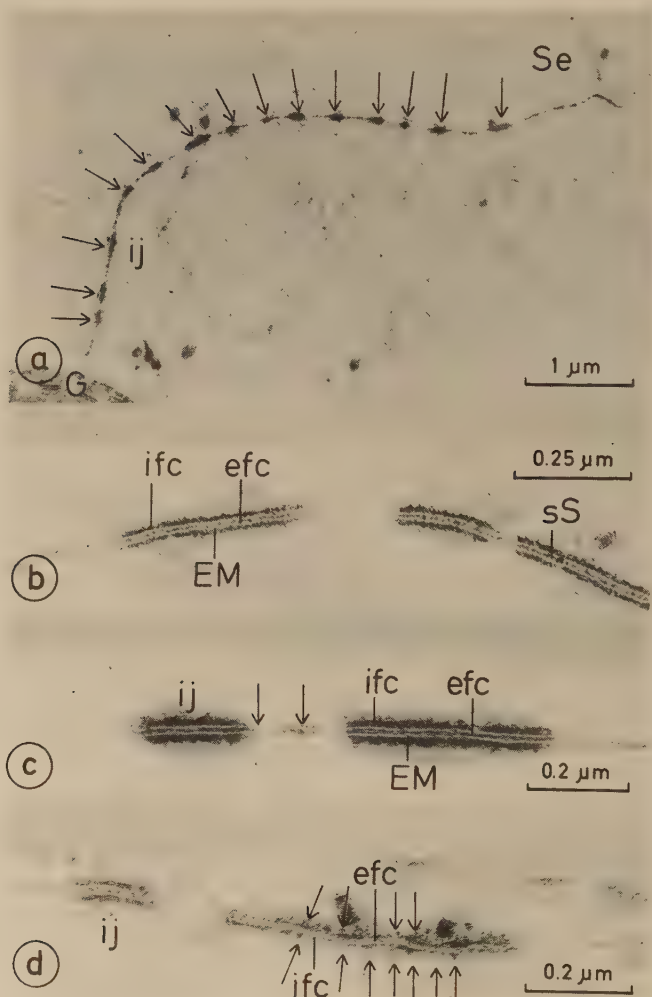


Abb. 8

E-PTA - IMPRÄGNATION

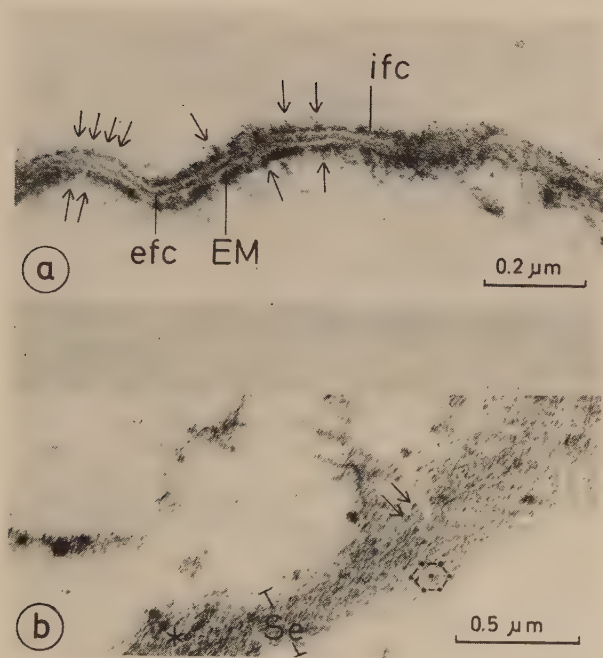


Abb. 9

BIUL - IMPRÄGNATION

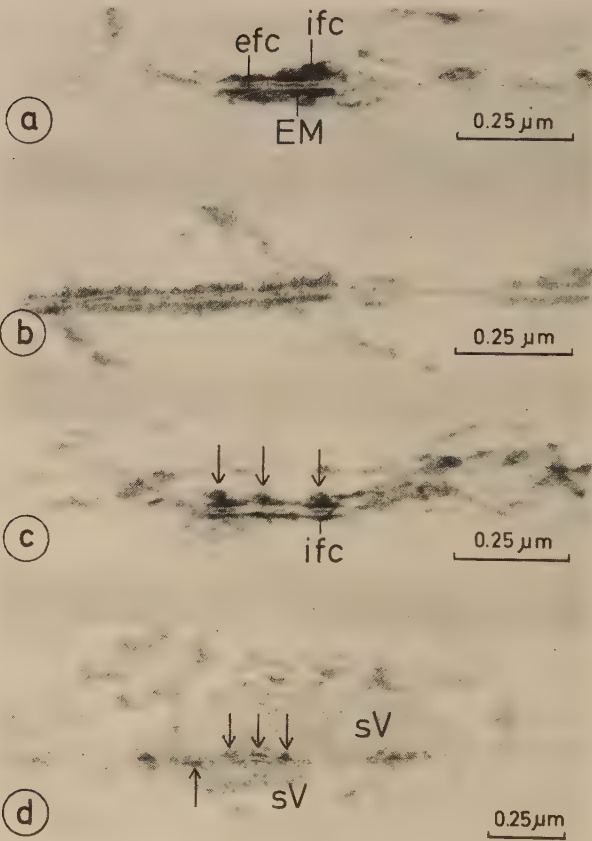
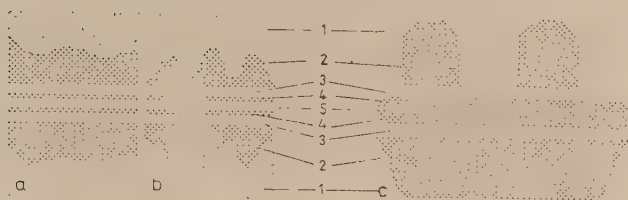


Abb.10

E-PTA-IMPRÄGNIERUNG:



BIUL- IMPRÄGNIERUNG:

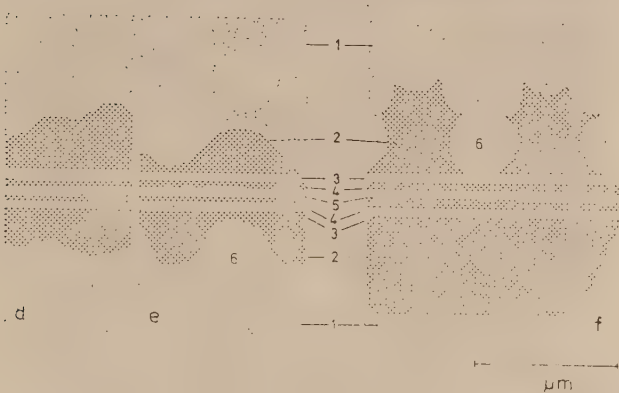


Abb.11

LANTHAN - IMPREGNATION

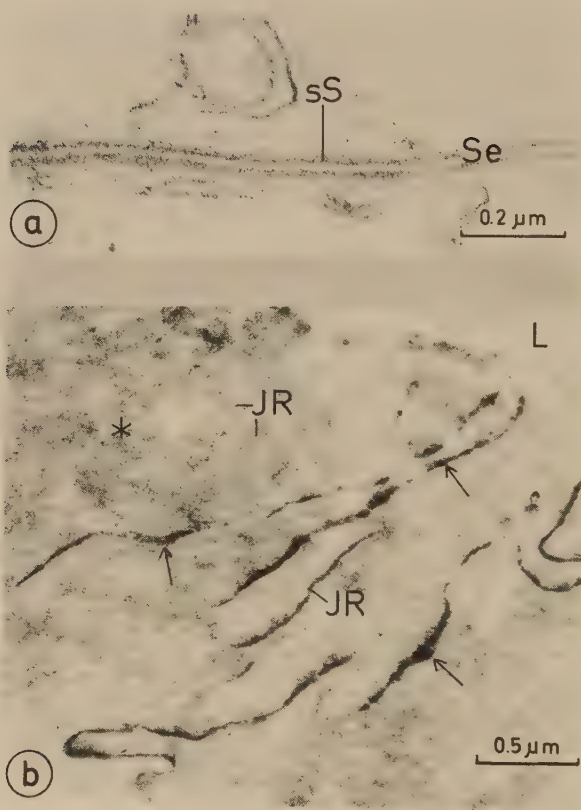


Abb.12

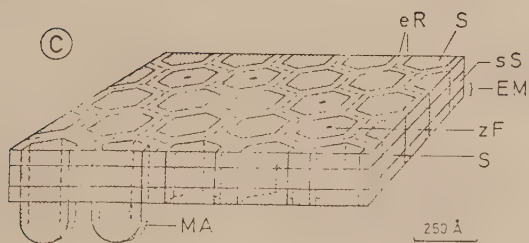
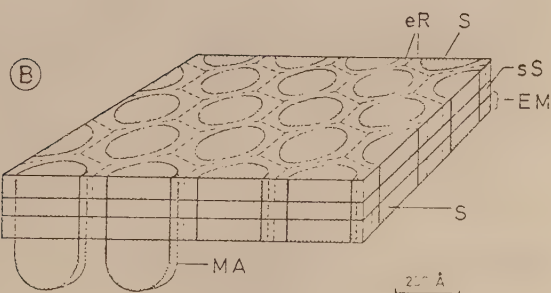
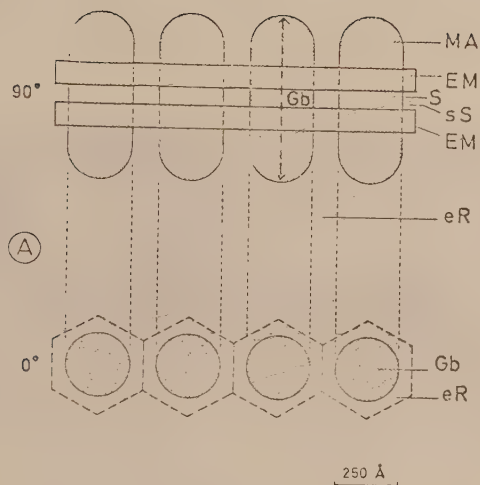


Abb. 13

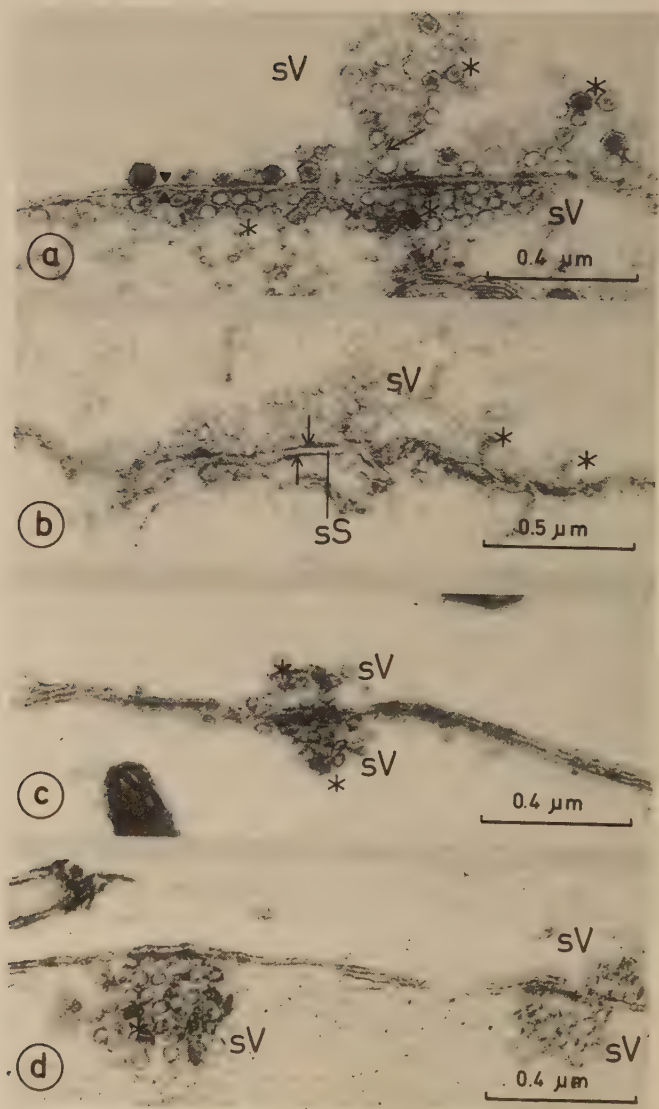


Abb. 14

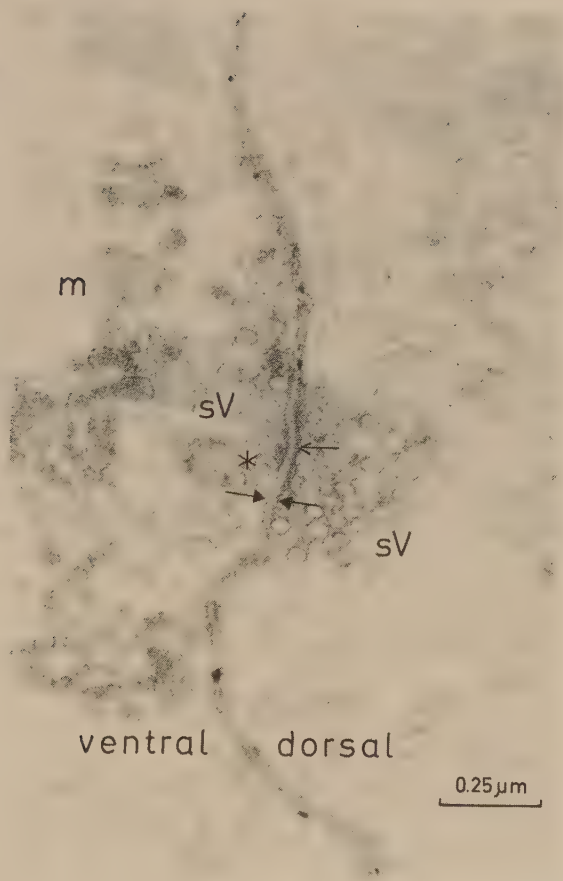


Abb.15

ZIO - IMPRÄGNATION

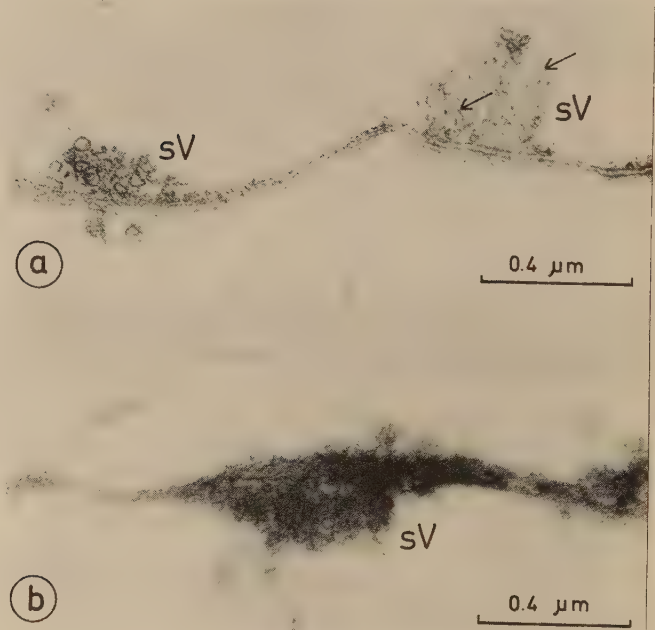


Abb. 16

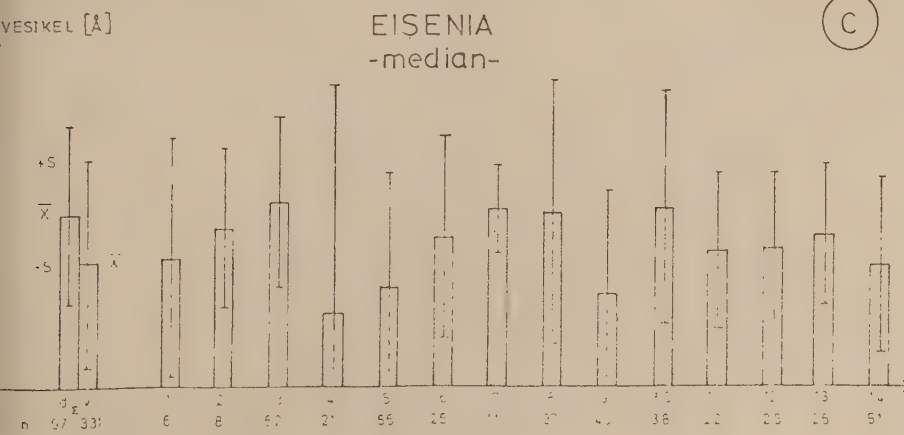
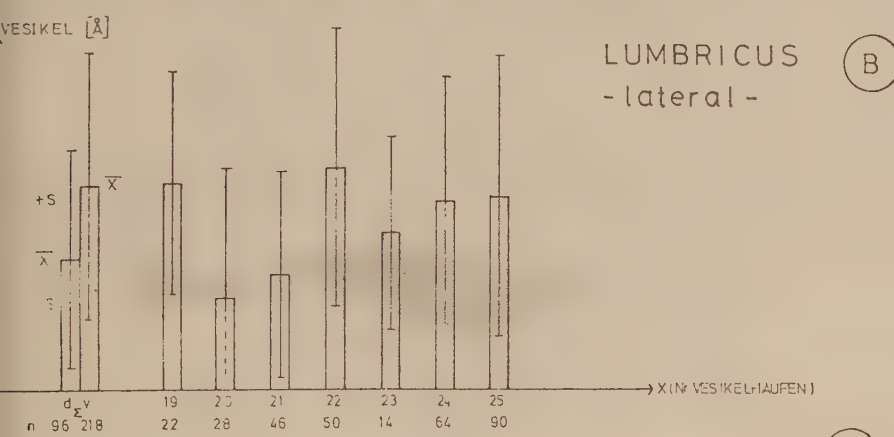
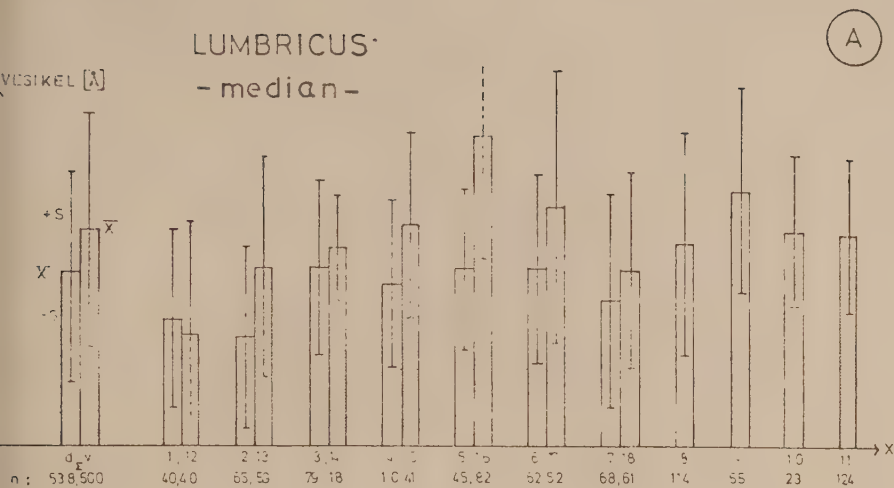


Abb.17

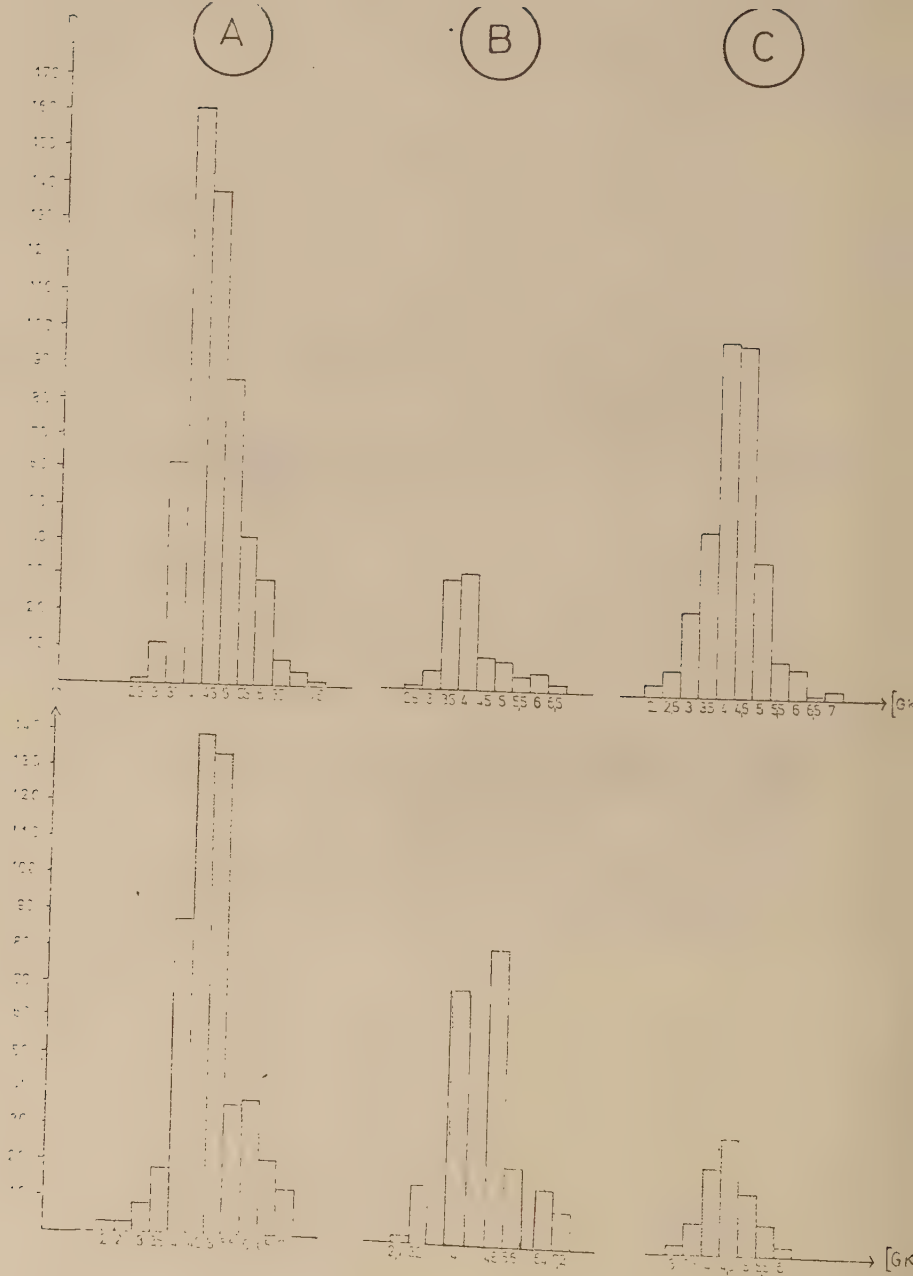
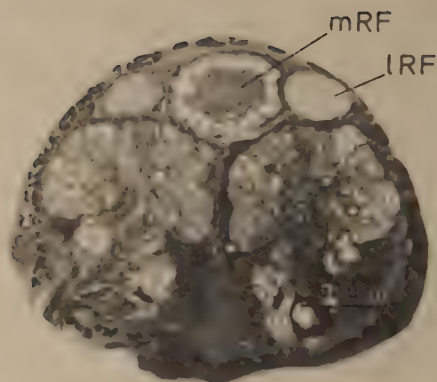


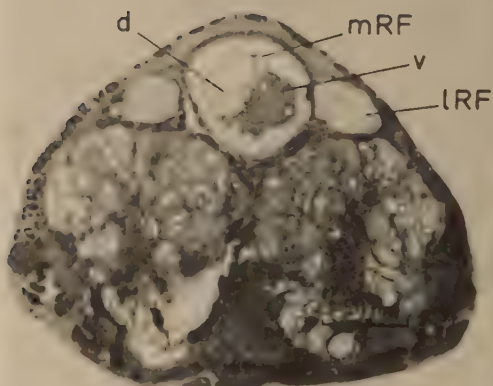
Abb. 18



(a)



(b)



(c)

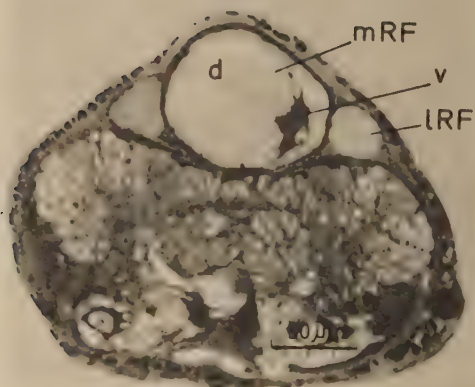
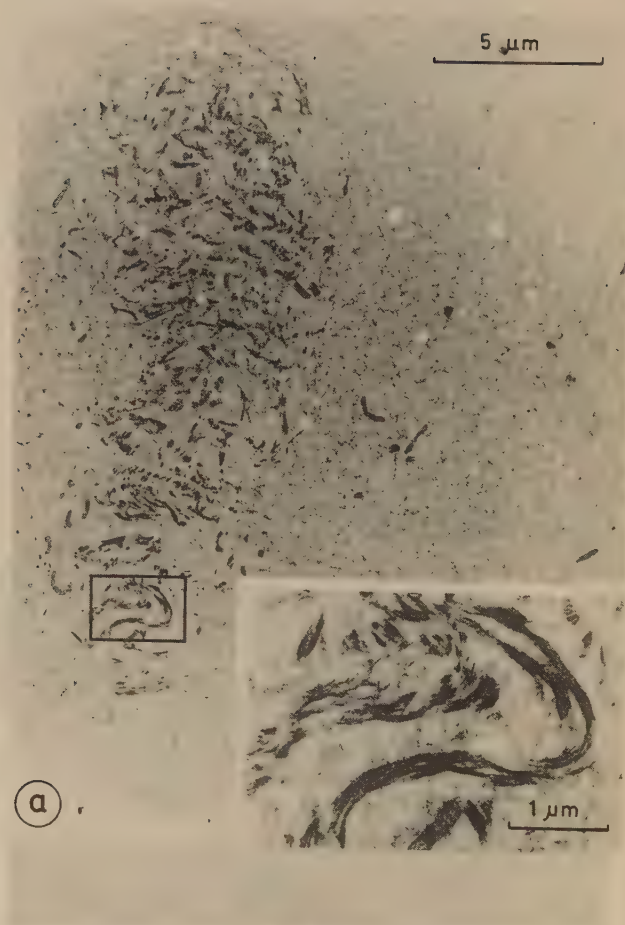
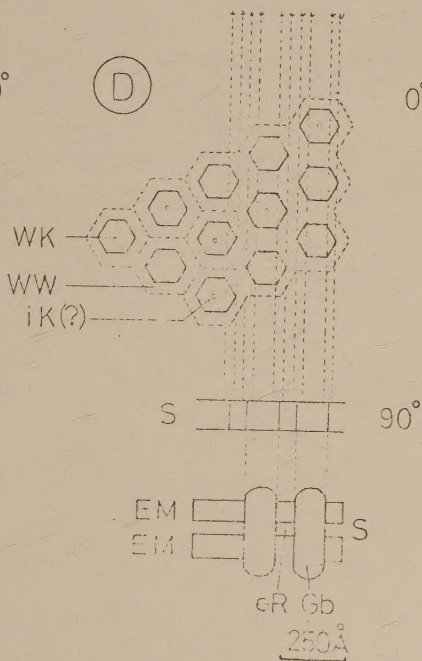
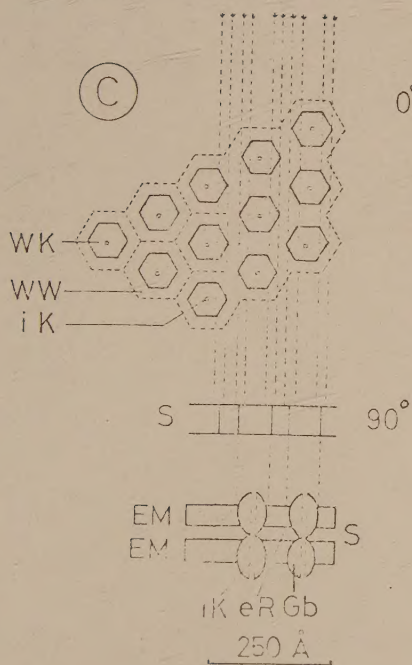
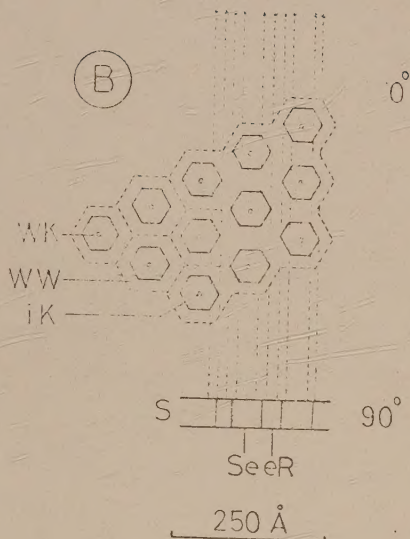
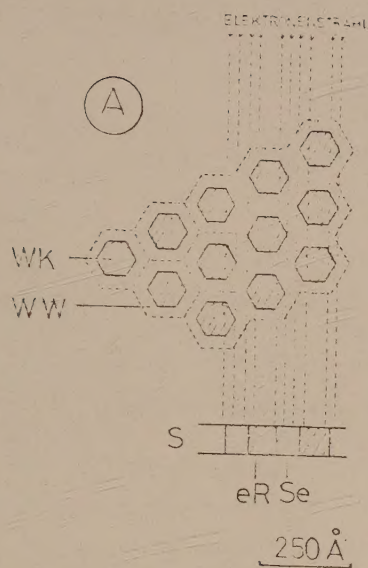


Abb 20



Abb. 21





LEBENS LAUF

Am 21.8.1943 wurde ich, Doris Oesterle, als einzige Tochter des Schriftsetzers Franz Oesterle (gefallen 1944) und seiner Ehefrau Emma, geb. Emmert, in Oberndorf/Neckar geboren.

Schulen:	1949-1954	Katholische Bekenntnisschule in Oberndorf/Neckar
	1954-1960	Progymnasium in Oberndorf/Neckar
	1960-1963	Droste-Hülshoff-Gymnasium in Rottweil/N.
Abitur:	1963	Frühjahr, in Rottweil/Neckar.
Studium:	1963-1965	Pädagogische Hochschule in Freiburg/Brsg., 1.Prüfung für das Lehramt an Volksschulen
	1965-1970	Universität München, Biologie und Chemie
Staatsexamen:	1970	Herbst, in Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien
Beginn der Doktorarbeit:	1.1.1971	
Seit 15.9.1975	Studienreferendarin am Asam-Gymnasium in München	

